

МИНИСТЕРСТВО ПРОСВЕЩЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Министерство образования Свердловской области

Управление образования города Первоуральска

МАОУ "Лицей №21"

РАССМОТРЕНО

педагогическим советом
МАОУ "Лицей №21"

протокол от «23» августа
2023 г., № 01

УТВЕРЖДЕНО

Приказ МАОУ "Лицей
№21"

приказ от «25» августа
2023 г. № 73

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА

(ID 3691266)

учебного курса «Практикум по микробиологии»

для обучающихся 10 –11 классов

Первоуральск 2023

Содержание

Практикум по микробиологии	3
Общие указания к проведению лабораторных работ (Правила работы в лаборатории)	5
Л/р №1 Дезинфекция и стерилизация	7
Л/р №2 Исследование степени загрязненности воздуха помещений методом оседания Коха	10
Л/р №3 Выращивание на питательной среде микроорганизмов зубного налета	13
Л/р №4 Изучение морфологии бактерий, грибов, дрожжей	14
Л/р №5 Приготовление препаратов микроорганизмов и их окраска	19
Л/р №6 Строение плесневых грибов и дрожжей	26
Л/р №7 Микроорганизмы вред или польза	35
Л/р №8 Влияние факторов внешней среды на развитие микроорганизмов	36
Л/р №9 Изучение морфологии дрожжей	47
Л/р №10 Изучение культуральных свойств выросших в чашках колоний	50
Л/р №11 Выращивание микроорганизмов	53
Л/р №12 Выращивание своих собственных микроорганизмов	54
Л/р №13 Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам	55
Раздел Цитологии. Л/р №14 Изучение плазмодесмы в клетках эндосперма хурмы	56
Л/р №15 Молодые клетки зачатка листа	57
Л/р №16 Живые клетки чешуи лука	58
Л/р №17 Строение зрелого листа элодеи	59
Л/р №18 Биологические мембраны. Плазмолиз	60
Л/р №19 Строение лейкопластов	62
Л/р №20 Крахмальные зерна	63
Л/р №21 Методы обнаружения белков	64
Л/р №22 Методы обнаружения углеводов	66
Приготовление красителей	68
Список используемой литературы	72

Пояснительная записка

Рабочая программа учебного курса «Практикум по микробиологии» разработана в соответствии с рабочей программой дисциплины «Биология и микробиология» для учеников школы и студентов, составленной на основе новых государственных стандартов. Он включает в себя лабораторные работы, которые охватывают основные разделы микробиологии.

Практикум составлен таким образом, чтобы закрепить теоретические знания по основным разделам курса, получить представление о строении живых организмов, показать их значение и развить у учащихся навыки практической работы. Поэтому перед каждой работой дается краткая теоретическая часть, необходимая для понимания эксперимента. Перед выполнением лабораторной работы учащиеся должны с ней ознакомиться.

При выполнении лабораторных работ учащиеся получают экспериментальные навыки, необходимые им для самостоятельной работы. Они осваивают методы биологического и микробиологического исследования, правила работы с биологическим материалом и культурами микроорганизмов.

Особое внимание уделено работе с микроскопом и правилам работы в лаборатории биологии и микробиологии. На первом занятии учащиеся должны ознакомиться с техникой безопасности, правилами работы в лаборатории и выполнять лабораторные работы в соответствии с этими правилами.

Результаты каждой лабораторной работы оформляются в виде отчета. Отчет выполняется рукописным методом в тетради или на отдельных листах с титульным листом на нечетной странице, у которого обратная сторона остается чистой. Далее следуют разделы в следующей последовательности: цель работы, задание, ход выполнения работы, таблицы, рисунки и общий вывод по результатам ее выполнения.

В основе лабораторных работ лежит Набор для проведения экспериментов по микробиологии.

ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

При выполнении лабораторных работ по биологии и микробиологии работают с различным биологическим материалом и культурами микроорганизмов. Изучают строение живых организмов и их основную структурную единицу – клетку. Клетки имеют небольшие размеры, поэтому невооруженным глазом их рассмотреть невозможно. Для их изучения готовят определенным образом препараты, которые рассматривают под микроскопом.

Микробиология изучает мельчайшие, невидимые невооруженным глазом существа – микробы. Они находятся повсюду: в почве, воздухе, воде, на сырье, различных материалах, оборудовании, продуктах питания и т. д. Одни из них безопасны для человека, другие могут вызывать различные заболевания.

Увидеть микроорганизмы, так же как и отдельные клетки, можно только под микроскопом, приготовив соответствующим образом препараты.

В лаборатории каждый работающий должен сидеть за отдельным столом.

В лаборатории должны быть созданы условия, обеспечивающие стерильность работы, при которых будет исключена возможность попадания как посторонних микроорганизмов извне, так и микроорганизмов из лаборатории в окружающую среду. Поэтому в микробиологической лаборатории необходимо строго соблюдать определенные правила работы и поведения, которые предотвращают возникновение заражения.

Правила работы в лаборатории

1. В помещение лаборатории нельзя входить без специальной одежды – халата.

2. Не разрешается выходить в халате за пределы лаборатории и надевать на халат верхнюю одежду.
3. В помещении лаборатории запрещается принимать пищу и хранить продукты питания.
4. Не выносить за пределы лаборатории какие бы то ни было посуду и материалы, которые используются для проведения лабораторных работ (пробирки, краски и т. д.).
5. Не класть на стол личные вещи (сумки, папки и др.), держать их на специально отведенных местах.
6. Если микроорганизмы попадают на оборудование или пол (разобьется пробирка или чашка Петри, на которой они росли), об этом надо сразу же сообщить преподавателю или лаборанту, а на данном месте провести обеззараживание, залив его дезинфицирующим раствором. После этого необходимо провести уборку.
7. Во время выполнения практических работ нельзя открывать форточки. Необходимо соблюдать тишину, избегать лишнего движения и хождения, открывания и закрывания дверей – всего того, что усиливает движение воздуха.
8. Перед началом работы дежурные проводят влажную уборку помещения, а столы протирают дезинфицирующим раствором.
9. Каждый учащийся перед началом работы должен проверить, все ли необходимое находится на его столе и исправен ли микроскоп.
10. Раздача необходимого для проведения лабораторной работы материала и посуды проводится лаборантом или дежурными.
11. На занятиях учащиеся должны иметь тетрадь и карандаши (простой и цветные – красный и синий). Рисунки при микроскопировании надо делать с препаратов, а не из книг или пособий.

12. По окончании работы все используемые инструменты обеззараживают. Бактериальные петли и иглы прокаливают над пламенем спиртовки, а пипетки и стекла помещают в дезинфицирующий раствор.

13. В конце занятий надо привести в порядок рабочий стол, протереть и убрать микроскоп, тщательно вымыть руки (при работе с заразным материалом их сначала дезинфицируют) и снять халат.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

ДЕЗИНФЕКЦИЯ И СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Цель работы:

Ознакомиться с методами дезинфекции и стерилизации.

Материалы и оборудование: чашки Петри, пробирки, пипетки, парафильм или пищевая пленка, спиртовка

Теоретическая часть:

В естественных условиях микроорганизмы подвергаются воздействию разных по своей природе факторов внешней среды, которые могут либо стимулировать (стимулирующее действие), либо замедлять и прекращать их развитие, тормозя метаболические процессы (бактериостатическое действие), либо вызывать гибель микроорганизмов (бактерицидное действие).

В зависимости от своей природы все факторы делятся на физические, химические и биологические. Наиболее сильное воздействие на микроорганизмы оказывают следующие физические и химические факторы: температура, влажность, осмотическое давление, ультрафиолетовые лучи, ионизирующая радиация, ультразвук, различные химические вещества и pH среды. Многие из этих факторов используются для подавления жизнедеятельности микроорганизмов.

Дезинфекция широко применяется не только в лабораториях микробиологии, но и на различных пищевых предприятиях. В качестве дезинфицирующих веществ наибольшее практическое применение находят хлорная известь (0,5–5%-ные водные растворы), хлорамина (1–5%-ные водные растворы), йод (2%-ный раствор), фенол и его производные (1–5%-ные растворы), этиловый и изопропиловый спирт (70%-ные растворы).

Выбор дезинфицирующего вещества, его концентрация, продолжительность срока дезинфекции зависят от конкретных условий: от того, что именно

подвергается дезинфекции, степени предполагаемого микробиального загрязнения, устойчивости обеззараживаемых микроорганизмов.

Стерилизация (обеспложивание) — это полное уничтожение всех микроорганизмов (вегетативных и споровых, патогенных и непатогенных) в обрабатываемом объекте. При проведении микробиологических исследований для получения правильных результатов необходимо обеспечить стерильность работы, т. е. не допустить попадания и развития посторонних микроорганизмов. Это достигается в результате проведения работ только при строго определенных условиях (определенных требованиях к помещению, оборудованию, посуде, питательным средам и т. д.).

Посуда, инструменты, питательные среды, используемые для работы в лаборатории микробиологии, должны быть стерильными, поэтому стерилизация является одной из важнейших операций в практике проведения микробиологических исследований.

Стерилизацию можно проводить различными способами: прокаливанием, паром под давлением, текущим паром, сухим жаром, кипячением, фильтрацией и др. Выбор способа стерилизации зависит от свойств стерилизуемого объекта, так как стерилизация не должна приводить к изменению его физического или химического состояния. Так, например, питательные среды никогда не будут стерилизовать сухим жаром, так как в их состав входит вода, которая при этом испарится.

Ход работы:

1. Подготовить посуду к стерилизации.

Перед стерилизацией лабораторную посуду моют и сушат. Новую посуду вначале кипятят в воде, в которую добавляют соляную кислоту так, чтобы получился 1%-ный раствор, затем промывают холодной водой и, не вытирая, высушивают. Посуду, бывшую в употреблении, выдерживают в 20%-ном растворе серной

кислоты в течение суток, затем моют в горячей воде, тщательно прополаскивают и высушивают.

Чашки Петри, пробирки и пипетки перед стерилизацией закрывают пленкой. Чашки Петри стерилизуют, завернув их в бумагу по 1–5 штук. В бумагу заворачивают и пипетки.

2. Приготовить к стерилизации 3–5 пробирок и 1–2 колбы. Для этого чистые пробирки и колбы закрывают пленкой.

3. Подготовить к стерилизации 3–5 пипеток.

В верхнюю часть каждой пипетки вставляют кусочек ваты, чтобы ее содержимое при работе не могло попасть в рот.

4. Подготовить к стерилизации вату и марлю.

Перед стерилизацией марлю нарезают кусочками, а вату сворачивают в виде шариков, после чего заворачивают их в плотную бумагу по 1–3 штуки так, чтобы она не разворачивалась. Удобно из бумаги сделать кулечки, положить туда вату или марлю и хорошо закрыть кулечки.

5. Провести стерилизацию посуды.

Подготовленную к стерилизации посуду и вату загружают в сушильный шкаф. Их кладут не слишком плотно, для того чтобы воздух мог хорошо циркулировать по всей камере и обеспечивался равномерный нагрев. После этого дверцу шкафа закрывают и включают нужную температуру.

6. Провести стерилизацию бактериальных петель.

Бактериальные петли стерилизуют в пламени спиртовки. Петли делают из нихромовой или платиновой проволоки, чтобы при прокаливании на них не появлялась окалина. Если петля сухая, то ее в вертикальном положении вносят в верхнюю, самую горячую часть пламени и прокаливают до красного каления сначала ее нижнюю, а затем верхнюю часть.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2

Исследование степени загрязненности воздуха помещений методом оседания Коха

Воздух – это среда, содержащая огромное количество микроорганизмов, которые могут с воздухом переноситься на значительные расстояния. В воздухе микроорганизмы сохраняются лишь некоторое время, после чего гибнут из-за воздействия ряда факторов: солнечной радиации, перепада температуры, отсутствия необходимых питательных веществ. Наиболее устойчивые микроорганизмы могут долго сохраняться в воздухе. К такой постоянной микрофлоре воздуха относятся споры грибов и бактерий, сарцины и др.

В воздухе закрытых помещений могут содержаться загрязнения бактериальной и химической природы. Они являются следствием физиологических обменных процессов человека, бытовых действий (напр., приготовления пищи). В воздух помещений может поступать также комплекс продуктов деструкции полимерных отделочных материалов и т. д. Наконец, газовый состав воздух закрытых помещений определяется газовым составом приточного атмосферного воздуха и химическими веществами-загрязнителями, выделяемыми внутри помещений.

В воздухе закрытых помещений обнаруживаются микроорганизмы, постоянно обитающие в больших количествах на слизистых оболочках верхних дыхательных путей человека. Они выделяются в окружающую среду при чиханье, кашле, смехе и разговоре с мельчайшими частицами слюны и носоглоточной слизи.

Основная причина загрязнения воздуха помещений жилых и общественных зданий – накопление углекислого газа, аммиака, сероводорода, летучих жирных кислот и др. В воздухе закрытых помещений находится много бактерий, так как в большинстве таких помещений неизбежно массовое хождение, сопровождающееся поднятием в воздух пыли.

Цель работы:

Исследование степени загрязнённости воздуха школьных помещений методом оседания Коха.

Материалы и оборудование: стерильные чашки Петри (5 шт.), алюминиевая фольга, стаканы с питательной средой, лупа, термостат. Стержень, основание штатива, марлевые повязки, перчатки, иглы, петли

Ход работы:

Основной этап работы включает проведение опыта. Опыт проводится 2 раза: первый раз – в конце учебного дня, второй раз – через 2 в начале учебного дня. После проведения основной части каждого опыта (поверхностный посев), чашки Петри помещаются в термостат при $t = +37^{\circ}\text{C}$ на неделю, после чего регистрируются результаты исследования.

Заключительный этап работы включает подсчёт колоний микроорганизмов и количественный учёт микробов в 1 м^3 воздуха каждого исследуемого помещения, составление выводов по работе, обсуждение итогов исследования, подготовку фотоотчёта и презентации.

Культивирование бактерий

Культивирование (выращивание) микробов, в частности, бактерий проводится на питательных средах.

Методика проведения исследования

Метод заключается в том, что чашку Петри с МПА оставляют на некоторое время открытой (поверхностный посев), а затем закрывают крышкой и ставят в термостат при $t = 37^{\circ}\text{C}$. О степени загрязнённости воздуха судят по количеству выросших колоний. Метод даёт приблизительные результаты количества микроорганизмов в единице объёма воздуха.

Чашки Петри с агаром ставим в разные помещения. Открываем на 5 минут, а затем закрываем. На крышке отмечаем место, где был проведён анализ. Чашки помещаем в термостат при $+ 37^{\circ}\text{C}$. (или в холодильник) Выдерживаем не более недели.

Подсчитывает под лупой число колоний, выросших на МПА. Определяем площадь дна чашки Петри. Зная число колоний, рассчитываем количество бактерий в 1 м³ воздуха.

На поверхности питательной среды в 100 см³ в течение 5 минут при спокойном состоянии оседает количество микроорганизмов, содержащихся в 100 л воздуха. Например, в чашке Петри диаметром 10 см выросло 25 колоний. Площадь питательной среды в чашке Петри равна 78,5 см². Вычисляем количество колоний на 100 см²:

25	колоний	—	78,5	см ²
X	колоний	—	100	см ²
X = 32 колонии				

Вычисляем количество бактерий в 1 м³ воздуха (1000 л):

32	—	10	л
X	—	1000	л
X = 3200 спор			

Следовательно, в 1 м³ воздуха содержится 3200 спор клеток микроорганизмов.

Критерии для оценки загрязнённости помещений по числу микроорганизмов в 1 м³ воздуха.

Оценка воздуха Летний режим

Зимний режим

	Количество микроорганизмов	Количество микроорганизмов
Чистый	1500	4500
Грязный	2500	7000

Результаты работы (как образец)

В ходе исследования для микробиологической оценки воздуха каждого помещения использовалось по 1 чашке Петри. На основании подсчёта колоний, выросших в чашках Петри, была проведена оценка содержания микроорганизмов в 1 м³ воздуха помещения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

Выращивание на питательной среде микроорганизмов зубного налета

Цель работы:

Вырастить и изучить микроорганизмы находящиеся в зубном налете.

Материалы и оборудование: чашка Петри, питательная среда Чапека, агар, шпатели, иглы, парафильм или пищевая пленка, зубочистки, марлевая повязка, перчатки.

Практическая часть:

1. Приготовить питательную среду и разлить ее по чашкам Петри, накрыть пленкой до опыта.
2. В чашке Петри на питательной среде оставить мазок с зубов
3. Наблюдать за ростом микроорганизмов
4. Охарактеризовать колонии микроорганизмов, используя теоретическую часть практикума.
5. Сделать выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4

Изучение морфологии бактерий, грибов и дрожжей

Цель работы:

Ознакомиться с морфологическим разнообразием бактерий и основными признаками, используемыми при их идентификации.

Материалы и оборудование: Микроскоп; пипетка; предметные стекла; спиртовка; иммерсионное масло; фильтровальная бумага; набор красок для окраски по Граму (фильтровальные бумажки с генцианвиолетом, растворы Люголя и фуксина рабочего) и окраски спор по Шефферу-Фултону (растворы бриллиантовой зелени и сафранина); 96 %-ный этиловый спирт; поднос для предметных стекол; промывалка; питательные среды с заранее выращенными бактериями и грибами; марлевая повязка, перчатки

Теоретическая часть:

Морфологические признаки бактерий

Бактерии объединяют обширную группу в основном одноклеточных микроорганизмов, разнообразную по форме, размерам и обмену веществ. Они являются прокариотными микроорганизмами.

При дифференциации бактерий путем микроскопии учитывают размеры и формы клеток, их взаимное расположение, химический состав и строение клеточных стенок, способность образовывать споры и капсулы, подвижность.

Основными формами бактерий, которые присутствуют в пищевом сырье, а также в продуктах растительного и животного происхождения, являются сферические бактерии (кокки) и палочковидные бактерии (палочки).

К основным морфологическим признакам кокков относятся их размеры (диаметр кокков в среднем составляет 1...2 мкм) и взаимное расположение. Взаимное расположение кокков определяется направлением образования перегородок при делении клеток. Если после деления клетки расходятся и располагаются поодиночке, то такие формы называются монококками или микрококками. Если при делении образуются скопления, напоминающие

виноградные грозди, их относят к *стафилококкам*. Кокки, остающиеся после деления в одной плоскости связанными парами, называются *диплококками*, а образующие разной длины цепочки – *стрептококками*. Сочетания из четырех кокков, появляющиеся после деления клетки в двух взаимно перпендикулярных плоскостях представляют собой *тетракокки*. Если кокки делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, то они образуют скопления кубической формы – *сарцины*. Как выглядят различные скопления кокков под микроскопом изображено на рис. 3.

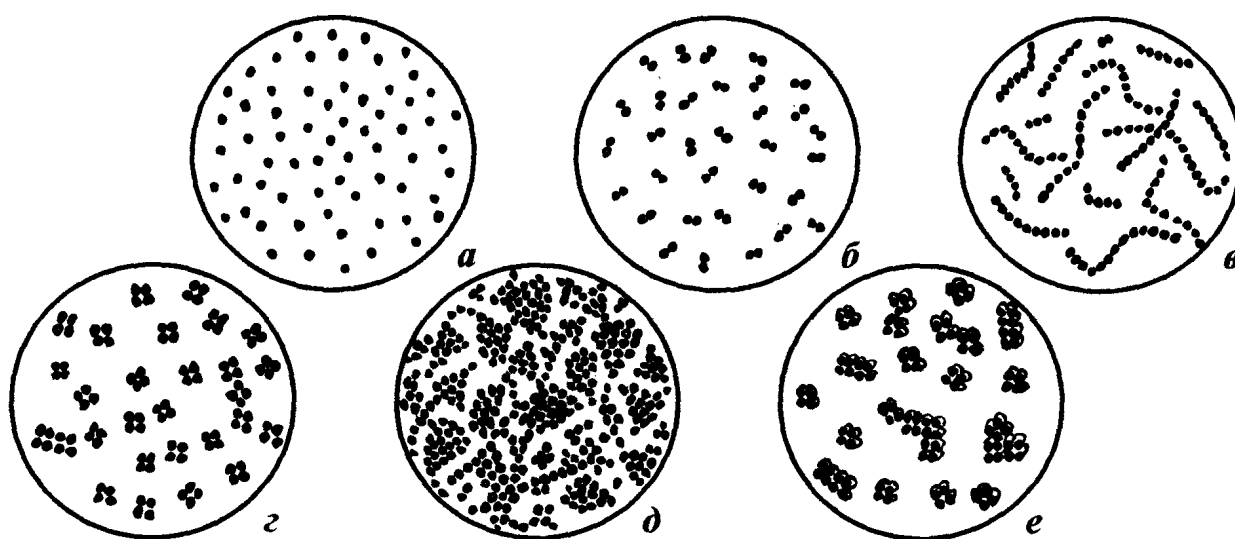


Рис. 3 Взаимные расположения кокков: а - микрококки; б - диплококки; в - стрептококки; г - тетракокки; д - стафилококки; е - сарцины

Основными морфологическими признаками палочковидных бактерий, которые определяются путем микроскопии, являются размеры палочек (средняя длина палочек – 2...7 мкм, диаметр в поперечнике - 0,5...1 мкм), взаимное расположение клеток, способность образовывать споры, подвижность.

Палочковидные бактерии могут располагаться поодиночке, попарно (*диплобактерии*) и цепочками (*стрептобактерии*).

При микроскопии легко можно определить спорообразующие и не спорообразующие формы палочковидных бактерий. Вегетативные клетки хорошо адсорбируют красители на своей поверхности и полностью окрашиваются. Оболочка споры малопроницаема, краски в них почти не проникают и под микроскопом споры имеют вид округлых или овальных блестящих зерен. Палочки,

образующие споры называются *бациллами* и *клостридиями*. У бацилл размер споры не превышает ширину клетки и поэтому при образовании споры форма клетки не меняется. У клостридий диаметр споры больше толщины клетки и поэтому при созревании споры клетка приобретает форму веретена (если спора располагается в центре клетки) или барабанной палочки (если спора располагается на одном из полюсов клетки). На рис. 4 представлены морфологические разновидности палочковидных бактерий.

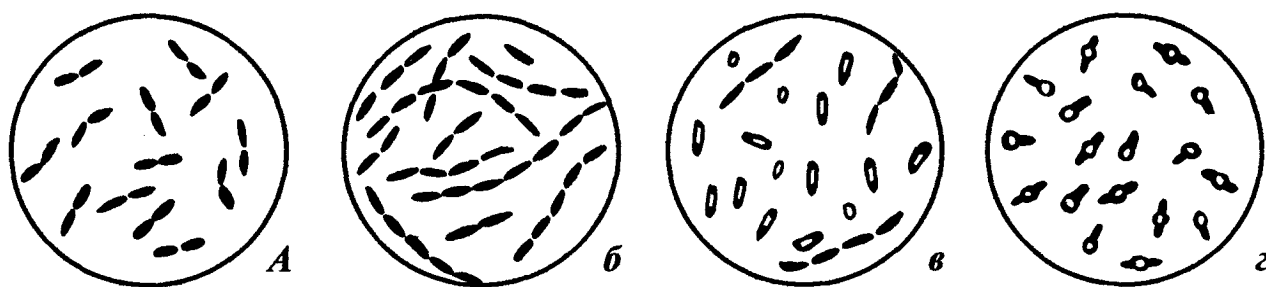


Рис. 4 Морфология палочковидных бактерий: а - диплобактерии; б - стрептобактерии; в - бациллы; г - клостридии

При идентификации палочек диагностическое значение имеют также расположение спор в клетках бацилл и клостридий, наличие и расположение жгутиков, способность образовывать капсулы.

Морфологические признаки грибов

Грибы относятся к царству Fungi (Mycetes, Mycota). Это многоклеточные или одноклеточные нефотосинтезирующие (бесхлорофилльные) эукариотические микроорганизмы с клеточной стенкой.

Грибы имеют ядро с ядерной оболочкой, цитоплазму с органеллами, цитоплазматическую мембрану и многослойную, ригидную клеточную стенку, состоящую из нескольких типов полисахаридов, а также белка, липидов и др. Некоторые грибы образуют капсулу. Цитоплазматическая мембрана содержит гликопротеины, фосфолипиды и эргостеролы. Грибы являются грамположительными микробами, вегетативные клетки — некислотоустойчивые.

Грибы состоят из длинных тонких нитей (гиф), сплетающихся в грибницу, или мицелий. Гифы низших грибов — фикомицетов — не имеют перегородок. У высших грибов — эумицетов — гифы разделены перегородками; их мицелий многоклеточный.

Различают гифальные и дрожжевые формы грибов.

Гифальные (плесневые) грибы образуют ветвящиеся тонкие нити (гифы), сплетающиеся в грибницу, или мицелий (плесень). Гифы, врастающие в питательный субстрат, называются вегетативными гифами (отвечают за питание гриба), а растущие над поверхностью субстрата — воздушными или репродуктивными гифами (отвечают за бесполое размножение).

Гифы *низших* грибов не имеют перегородок. Они представлены многоядерными клетками и называются ценоцитными.

Гифы *высших* грибов разделены перегородками, или септами с отверстиями. Дрожжевые грибы (дрожжи), в основном, имеют вид отдельных овальных клеток (одноклеточные грибы). По типу полового размножения они распределены среди высших грибов — аскомицет и базидиомицет. При бесполом размножении дрожжи образуют почки или делятся, что приводит к одноклеточному росту. Могут образовывать псевдогифы и ложный мицелий (псевдомицелий) в виде цепочек удлинённых клеток — «сарделек». Грибы, аналогичные дрожжам, но не имеющие полового способа размножения, называют дрожжеподобными. Они размножаются только бесполом способом — почкованием или делением.

Грибы размножаются спорами половым и бесполом способами, а также вегетативным путем (почкование или фрагментация гиф). Грибы, размножающиеся половым и бесполом путем, относятся к совершенным. Несовершенными называют грибы, у которых отсутствует или еще не описан половой путь размножения. Бесполое размножение осуществляется у грибов с помощью эндогенных спор, созревающих внутри круглой структуры — спорангия, и экзогенных спор — конидий, формирующихся на кончиках плодоносящих гиф.

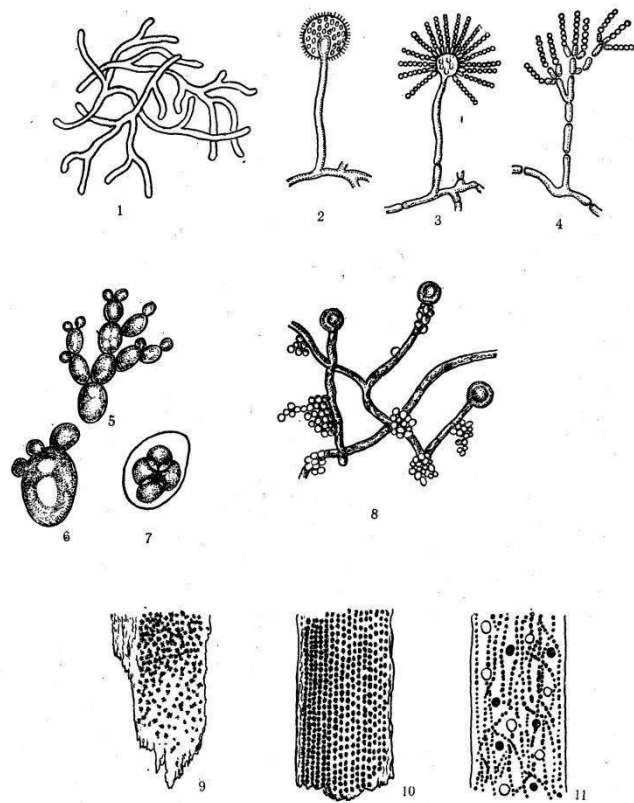


Рис. 16. Морфология грибов и актиномицетов.
 1 — актиномицет; 2 — мукор; 3 — аспергилл; 4 — пеницилл; 5–7 — дрожжи;
 8 — дрожжеподобный гриб (кандида); 9–11 — дерматомицеты в пораженном
 волосе (микроспорин, трихофитон, ахорион). microbiology-usa.org

Практическая часть:

1. Взять чашки Петри с выращенными колониями грибов и бактерий, с помощью пипетки сделать микропрепараты бактерий и грибов.
2. Рассмотреть препараты под микроскопом.
3. Зарисовать увиденные клетки грибов и бактерий.
4. Сделать выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

Приготовление препаратов микроорганизмов и их окраска

Цель работы:

Научиться готовить препараты микроорганизмов и проводить их окраску.

Задачи:

1. Ознакомиться с приготовлением препаратов бактерий в «раздавленной» и «висячей» каплях.
2. Приготовить три препарата и окрасить их:
 - первый – простым способом;
 - второй – сложным способом (по Граму);
 - третий – способом, при котором окрашиваются споры.
3. Промикроскопировать окрашенные препараты.
4. Оформить отчет, зарисовать увиденное под микроскопом в тетрадь и сделать выводы.

Материалы и оборудование: предметные стекла, иглы, петли, спиртовка, пинцет, генцианвиолет, йод, фильтровальная бумага, этиловый спирт, 96% р-р спирта, р-р Люголя, эфир, карболовый фуксин Циля, 0,5% р-р соляной кислоты, 5% р-р серной кислоты, метиленовая синь Лефлера, марлевые повязки, перчатки.

Теоретическая часть

Микроскопирование микроорганизмов можно проводить на живых видах и в убитых культурах, в окрашенном и неокрашенном состоянии. Микроорганизмы содержат большое количество воды, и свет через них хорошо проходит, поэтому для того, чтобы увидеть их под микроскопом, необходимо правильно приготовить соответствующие препараты.

Препараты обычно готовят на предметном стекле. Помимо них, иногда используют и покровные стекла. Все стекла, используемые для приготовления препаратов, должны быть безупречно чистыми. Для этого их предварительно тщательно моют.

Для определения формы или выявления подвижности микроорганизмов их микроскопируют в живом состоянии. Для этого готовят препарат типа «раздавленная капля» или «висячая капля».

Раздавленная капля. Для приготовления этого препарата на середину предметного стекла наносят каплю воды или другой прозрачной жидкости и вносят в нее немного исследуемых микроорганизмов. Каплю осторожно накрывают («раздавливают») покровным стеклом. Для этого покровное стекло берут за грани, ставят на ребро у края капли и осторожно опускают, постепенно вытесняя воздух между покровным и предметным стеклом, чтобы не допустить образования в жидкости пузырьков воздуха.

Жидкость должна тончайшим слоем заполнить все пространство между стеклами, но не выступать за края покровного стекла. Излишек выступившей жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Если жидкости недостаточно и между стеклами осталась воздушная полость, воду, наоборот, добавляют, подпуская ее стеклянной палочкой под покровное стекло, или заново переделывают препарат.

При исследовании бактерий и дрожжей, выращенных на плотной среде, берут небольшое их количество бактериологической иглой, предварительно прокаленной в пламени спиртовки и охлажденной. Затем вносят их в каплю воды, которую нанесли на предметное стекло, и тщательно перемешивают. При исследовании грибов берут небольшой комочек мицелия с помощью двух препаровальных игл (вставленных в пластмассовые или деревянные палочки). Мицелий помещают на предметное стекло в каплю смеси спирта и глицерина и осторожно расщепляют иглами, стараясь как можно лучше разъединить гифы.

Если исследуемые микроорганизмы (бактерии, дрожжи, споры грибов) находятся в жидкой среде, то на предметное стекло наносят каплю микробной суспензии (взвеси) без добавления воды или другой жидкости. Суспензию берут стеклянной палочкой или бактериологической петлей.

Бактерии и дрожжи микроскопируют с объективом 40х, грибы – с объективами 8х или 10х и 20х или 40х. Можно микроскопировать их и с объективом 90х или 100х, используя при этом особо тонкое покровное стекло, на поверхность которого наносят иммерсионное масло.

Микроорганизмы, находящиеся в препарате «раздавленная капля», можно изучать и в темном поле зрения. В этом случае толщина предметных стекол не должна превышать 1,2 мм, а покровных – 0,2 мм. Микроскопирование в темном поле проводят на обычном световом микроскопе, заменив в нем конденсор на темнопольный. В таком конденсоре центральная часть затемнена и свет проходит только через периферийную часть линзы. Он проходит его под углом, и поэтому в глаза исследователя прямые лучи света не попадают. Виден только свет, отраженный от микроорганизмов. Поэтому микроорганизмы видны на темном фоне как ярко освещенные частицы.

Для изучения подвижности микробов, процесса прорастания спор и т. д. готовят препарат типа «висячая капля». Для этого на середину необезжиренного покровного стекла наносят каплю жидкости с микроорганизмами. Края стекла смазывают вазелином, осторожно переворачивают и кладут на предметное стекло, которое посередине имеет углубление, так, чтобы капля находилась в углублении. Она должна свободно свисать, не касаясь краев или дна углубления.

В подавляющем большинстве под микроскопом рассматривают окрашенные препараты микроорганизмов. Окраска микроорганизмов зависит от физико-химических особенностей микробной клетки и взаимодействия ее структур и веществ с используемыми реактивами.

Способы окрашивания делятся на простые и сложные. При простых способах окраски используют один краситель, например фуксин. Такая окраска применяется для ознакомления с морфологией бактерий.

При сложных способах окраски применяют два или более красителя и используют различные обесцвечивающие вещества(чаще всего спирт). Такое окрашивание позволяет выявить детали строения микроорганизмов (споры, запасные питательные вещества и т. д.) и провести их дифференциацию (различить бактерии, сходные по внешнему виду, но принадлежащие к разным видам.) Окраска спор бактерий производится с применением притравы (кислот, щелочей) для разрыхления оболочки спор, что облегчает проникновение в них краски.

Независимо от того, каким способом будет вестись окраска микроорганизмов, предварительно надо приготовить, высушить и зафиксировать мазок. Фиксацию надо проводить для того, чтобы закрепить микроорганизмы на стекле. Только в этом случае микроорганизмы хорошо окрасятся, при окрашивании останутся на стекле и не будут смыты водой.

Ход работы:

1. Приготовить препараты.

На середину чистого предметного стекла наносят каплю воды. В нее вводят немного бактерий, взятых с плотной питательной среды кончиком стерильной бактериологической иглы. Тщательно перемешивают петлей полученную суспензию (она должна быть слабомутной) и равномерно распределяют (размазывают) ее тонким слоем по поверхности предметного стекла на площади 2–3 см².

Полученный мазок высушивают при комнатной температуре на воздухе или (для ускорения) в токе теплого воздуха пламенем спиртовки, не допуская перегрева стекла (стекло надо держать мазком вверх). После этого мазок фиксируют, для чего стекло с сухим мазком проводят 3–4 раза над пламенем спиртовки, прикасаясь к

нему той стороной, где мазок отсутствует. Мазки бактерий можно фиксировать этиловым спиртом, смесью этилового спирта и эфира, а также другими веществами (фиксаторами).

2. Окрасить препараты.

2.1. Окраска простым способом.

На охлажденный фиксированный мазок наносят на 20–40 с 2–3 капли карболового фуксина Циля, после чего краску смывают водой из промывалки. Промывание заканчивают, когда вода станет бесцветной. Промытый препарат просушивают на воздухе. Для более быстрого высыхания нижнюю часть стекла и края, на которых нет препарата, можно промокнуть фильтровальной бумагой.

2.2. Окраска спор бактерий.

Для окраски спор готовят мазок бактерий так, как описано в п. 2.1, но не фиксируют его.

2.2.1. На сухой мазок наносят 1–2 капли 0,5%-ного раствора соляной кислоты и нагревают его в течение 1–2 мин над пламенем спиртовки (до выделения паров).

2.2.2. Остатки кислоты сливают, мазок промывают водой, высушивают на воздухе и фиксируют в пламени спиртовки (как указано в п. 4.1).

2.2.3. На охлажденный фиксированный мазок наносят 1–2 капли фуксина Циля и нагревают над пламенем спиртовки до появления пара. При этом необходимо следить, чтобы раствор краски не подсох.

2.2.4. Краситель смывают водой и погружают препарат в стаканчик с 5%-ным раствором серной кислоты на 20–40 с, после чего его сразу же промывают водой. При погружении в кислоту протоплазма клеток обесцвечивается, а споры остаются окрашенными.

2.2.5. На промытый препарат наносят на 3–5 мин метиленовую синь Лефлера (2–3 капли), после чего препарат тщательно промывают водой и высушивают.

При этом способе окраски споры окрашиваются в красный цвет, а клетки – в голубой.

3. Окрасить бактерии по методу Грама.

Сущность метода заключается в том, что бактерии последовательно окрашиваются красителем генцианвиолетом и йодом, а затем обрабатываются спиртом. При этом одни бактерии – грамположительные – остаются окрашенными, а другие – грамотрицательные – обесцвечиваются. Это связано с тем, что у грамположительных бактерий образовавшееся окрашенное соединение при обработке спиртом удерживается в протоплазме клетки, а у грамотрицательных оно вымывается из клетки.

Приготовить мазок так, как указано в п. 1.

3.1. На фиксированный мазок кладут полоску фильтровальной бумаги, наносят на нее в том месте, под которым находится мазок, 3–4 капли раствора генцианвиолета, и при помощи пинцета разглаживая бумагу, плотно прижимают к стеклу. Через 2 мин бумагу снимают, а излишки краски смывают водой.

3.2. На мазок наносят 3–4 капли раствора Люголя (раствор йода в йодистом калии) и по истечении 2 мин сливают его.

3.3. Препарат погружают в стаканчик с 96%-ным спиртом на 30–40 с и сразу же после этого промывают водой.

3.4. На препарат наносят на 2 мин разбавленный раствор фуксина. После этого промывают его водой и просушивают.

При данном способе окраски грамположительные бактерии будут фиолетовыми, а грамотрицательные – красными, так как после обесцвечивания спиртом они окрашиваются фуксином.

Внимание! При недостаточной обработке мазка спиртом все клетки сохраняют свою окраску, а при избыточной все обесцвечиваются.

2. Микроскопировать окрашенные препараты.

Все окрашенные препараты последовательно микроскопируют сначала с объективом 8х или 10х, а затем наносят на них каплю иммерсионного масла и микроскопируют с объективом 90х или 100х. Увиденное в микроскоп при большом увеличении (объектив 90х или 100х) зарисовывают в тетради. Делают выводы о наличии у разных микроорганизмов спор и об их отношении к окраске по Граму.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6

Строение плесневых грибов и дрожжей

Цель работы:

Изучить морфологию плесневых грибов и дрожжей и научиться определять по ключу принадлежность грибов.

Материалы и оборудование: предметное стекло, покровное стекло, микроскоп, р-р Люголя, судан III, этиловый спирт, иглы, питательные среды с выращенными микроорганизмами.

Теоретическая часть

Дрожжи являются одноклеточными неподвижными организмами. Клетки дрожжей могут иметь округлую, овальную, эллипсоидальную или цилиндрическую форму. Длина клеток колеблется от 5–6 до 10–15 мкм, а ширина – от 2 до 5 мкм. Форма и размеры дрожжей изменяются в зависимости от условий.

Дрожжи относятся к истинно ядерным организмам. Их клетка снаружи покрыта оболочкой, внутри которой находится цитоплазма с различными органоидами и ядро. В цитоплазме находятся запасные питательные вещества (гликоген, волютин, капли жира) и заполненные клеточной жидкостью вакуоли.

Наиболее характерным способом размножения у дрожжей является почкование. Этому предшествует деление ядра. Затем на материнской клетке образуется небольшая выпуклость (иногда их может быть несколько) – почка, в которую переходит одно ядро с частью цитоплазмы и органоидами, после чего почка отшнуровывается от клетки. Иногда почки, еще не отделившись, в свою очередь начинают почковаться, образуют скопление дрожжевых клеток – сrostки почкования.

Истинным дрожжам свойственно размножение при помощи спорообразования. Споры у дрожжей обычно возникают бесполом путем. Образующиеся споры

находятся в клетке как в сумке (аскоспоры). Количество спор в одной дрожжевой клетке колеблется от 1 до 12, но чаще всего бывает 4 споры.

Некоторые дрожжи могут размножаться простым делением пополам. При этом посредине клетки образуется перегородка, в результате чего клетка делится на две обычно равные части.

Дрожжи широко используются в пищевой промышленности (хлебопечении, молочной промышленности и др.).

Плесневые грибы. Строение плесневых грибов более сложное, чем дрожжей. У них различают клетку гриба и его тело. Клетка гриба по своему строению похожа на растительные клетки, только лишена хлорофилла. Тело состоит из тонких (5–15 мкм) длинных нитей – гифов. Гифы ветвятся и переплетаются, образуя тело гриба, которое называется мицелием.

Гифы растут своей вершиной или концами разветвлений. Снаружи гифы покрыты оболочкой. В состав оболочки некоторых грибов входит хитин. Внутри гифа находится цитоплазма с органоидами и одним или несколькими ядрами. Среди грибов распространена многоядерность клеток.

Среди грибов встречаются как одноклеточные, так и многоклеточные. У одноклеточных гифы не имеют поперечных перегородок и мицелий представляет собой одну клетку (несептированный мицелий). У многоклеточных грибов гифы разделены поперечными перегородками на отдельные клетки (септированный мицелий). Часть мицелия обычно развивается в субстрате, а часть – на поверхности, образуя воздушный мицелий. На воздушном мицелии образуются особые гифы, несущие споры.

Отличительной особенностью грибов является разнообразие способов размножения. У большинства грибов любая часть мицелия может дать начало новому грибу. Но наиболее распространенным способом размножения грибов является спорообразование. При этом споры могут образовываться как бесполым,

так и половым путем. При половом размножении спорообразованию предшествует половой процесс – слияние двух клеток.

При бесполом процессе спорообразования споры чаще всего образуются на особых гифах, отличающихся строением и положением от других гифов мицелия, реже – прямо на мицелии.

У одних грибов споры образуются на вершине гифов снаружи (экзоспоры). Такие споры называются конидиями. Они могут находиться или на особых гифах – конидиеносцах, или прямо на мицелии. Конидии могут располагаться как непосредственно на верхушке конидиеносцев, так и на особых клетках – стеригмах, покрывающих верхушку конидиеносцев. Конидии могут располагаться поодиночке, образовывать цепочки и т. д.

У других грибов споры образуются внутри особой клетки на конце гифа (эндоспоры). Эти клетки называются спорангием. Гиф, на котором расположены спорангии, называется спорангиеносцем. От гифа спорангий отделен перегородкой. Внутри спорангия образуется большое количество спор.

Они называются спорангиеспорами.

Спорангиеспоры образуются путем расщепления многоядерной цитоплазмы молодого спорангия на отдельные части. У некоторых грибов в спорангиях образуются подвижные споры – зооспоры.

При половом размножении спорообразованию предшествует половой процесс, при котором две клетки соединяются и образуют одну – зиготу. У низших грибов редукционное деление наступает сразу после слияния клеток, поэтому диплоидной является только зигота.

У высших грибов ядра двух соединившихся клеток могут не сливаться длительное время. В результате этого возникают двуждерные клетки – дикарионы, которые могут многократно делиться. Затем происходит слияние ядер отцовского и материнского организмов. После этого наступает редукционное деление и

образуются гаплоидные споры. Таким образом, у грибов, в отличие от высших организмов, клетки гаплоидные, а диплоидная фаза непродолжительна.

Один и тот же гриб может размножаться и бесполом, и половым путем. Происходит чередование способов размножения, при этом половое обычно наступает при недостатке питания. Способы и органы размножения грибов характерны для каждого вида, по-этому именно они положены в основу классификации грибов.

Для жизнедеятельности грибов нужны готовые органические вещества и кислород, так как они являются аэробными организмами. Отличительной особенностью грибов является то, что они способны развиваться при очень низкой влажности (до 11–13%).

Ход работы:

1. Изучить морфологию дрожжей.

1.1. Приготовить препарат дрожжей типа «раздавленная капля». Для этого на предметное стекло нанести каплю суспензии дрожжей и осторожно накрыть покровным стеклом. Препарат типа «раздавленная капля» быстро высыхает, поэтому его микроскопирование следует проводить сразу же после приготовления.

1.2. Промикроскопировать препарат дрожжей сначала на увеличении 8х или 10х, а затем на увеличении 20х или 40х.

Рассмотреть и зарисовать форму клеток дрожжей и их строение, выявив оболочку, цитоплазму, вакуоли и включения запасных питательных веществ. Цитоплазма под микроскопом видна как более темная зернистая масса, гликоген выявляется при виде плотных темных зерен, вакуоли – при виде светлых прозрачных пятнышек, капли жира – при виде светлых и блестящих пятнышек, так как они сильно преломляют свет.

Убедиться в том, что дрожжи не могут активно двигаться, поскольку не обладают специальными органами передвижения – жгутиками. Для них характерно только пассивное броуновское движение с током жидкости, которым обладают все взвешенные частицы. В отличие от него активное движение имеет различные характер и направление.

1.3. Установить химическую природу внутриклеточных включений. Для этого применяют микрохимические реакции. Для определения гликогена к капле дрожжей добавляют каплю раствора Люголя. Препарат закрывают покровным стеклом и микроскопируют с увеличением 20х или 40х. Наблюдают зерна гликогена, который окрасился в красно-бурый цвет. Надо учитывать, что в молодых и старых клетках дрожжей содержание гликогена обычно очень мало.

Для определения жира к капле дрожжей добавляют каплю 0,5%-ного спиртового раствора краски судан-III. Препарат закрывают покровным стеклом и микроскопируют с увеличением 20х или 40х. Наблюдают капли жира, который окрасился в красно-желтый цвет.

1.4. Найти и зарисовать почкующуюся клетку.

2. Изучить морфологию плесневых грибов и по ключу определить их вид.

2.1. Приготовить препарат плесневых грибов типа «раздавленная капля». Для этого на чистое, обезжиренное предметное стекло наносят каплю этилового спирта или смеси равных объемов этилового спирта и глицерина. Двумя препаровальными иглами берут небольшой кусочек воздушного мицелия плесневого гриба так, чтобы на нем обязательно были органы размножения (конидии или спорангии), и помещают в приготовленную каплю. Иглой осторожно расправляют гифы, стараясь не повредить мицелий и особенно органы размножения. После этого накрывают препарат покровным стеклом. Старые культуры для исследования брать не рекомендуется, так как при приготовлении из них препарата органы размножения легко разрушаются.

2.2. Промикроскопировать препарат плесневых грибов.

Сначала его рассматривают при увеличении объектива 8х или 10х, затем при увеличении 20х. Найти органы размножения грибов и определить, что это: конидии или спорангии. Затем найти гифы, на которых они находятся, определить их вид и расположение на мицелии и относительно друг друга.

2.3. По ключу определить видовое название гриба.

Найти на препарате один из признаков, соответствующий первому пункту ключа, и в соответствии с ним переходить к следующему, на который указывает цифра, стоящая в конце предложения. Например, если при микроскопировании установлено, что грибы размножаются спорангиоспорами, находящимися внутри спорангиев, то переходят к пункту 2. На это указывает цифра 2. Если же грибы размножаются конидиями, образующимися снаружи на особых конидиеносцах, реже прямо на мицелии, то переходят к пункту 5.

Микроскопирование препарата в соответствии с пунктами ключа продолжают до тех пор, пока не придут к родовому названию гриба.

2.4. Записать в тетради все пункты ключа, которые проходили при определении названия.

2.5. Зарисовать в тетрадь все признаки, увиденные под микроскопом, по которым определено видовое название гриба, и дать к ним пояснения.

Приложение 2.

Ключ к определению родового названия грибов

1. Грибы размножаются спорангиоспорами, находящимися внутри спорангиев – 2. Грибы размножаются конидиями, образующимися снаружи на особых конидиеносцах, реже прямо на мицелии – 5.

2. Спорангиеносцы, несущие спорангии, обычно простые, реже – просто ветвящиеся. Спорангии все одинаковые – 3.

Спорангиеносцы ветвящиеся. Спорангии двух видов: крупные – на главной оси и мелкие (спорангиоли) – на боковых ветвях – 4.

3. Спорангиеносцы одиночные, простые, иногда ветвящиеся. Спорангии мелкие или крупные, всегда однородные, бесцветные или окрашенные. Споры округлые или эллипсоидальные, гладкие бесцветные или сероватые. – Мукор.

Спорангиеносцы расположены кустиками, вырастающими на стлонах из одного центра, с большими черными головками.

Споры округлые, яйцевидные, морщинистые. – Ризопус.

4. Кустовидные ветви расположены мутовчато на главной оси спорангиеносца в один или несколько ярусов. Места ответвления нераздуты. Споры цилиндрические и эллипсоидальные, бесцветные. – Тамнидиум.

Кустовидные ветви отходят от вздутый на главной оси спорангиеносца. Ветви второго порядка также отходят от вздутых мест.

Спорангиоли сидят на вздутиях мелких конечных ветвей. Споры эллипсоидальные или шаровидные, бесцветные. – Хетостилум.

5. Конидии образуются на особых конидиеносцах, отличных от обыкновенных вегетативных гифов – 6.

Конидиеносцы или мало отличаются от обыкновенных гифов, или их нет вовсе, и конидии образуются прямо на мицелии – 14.

6. Конидиеносцы обильно ветвятся различным образом – 7.

Конидиеносцы не ветвятся или иногда ветвятся, но слабо. Ветвление простое, вильчатое или кустообразное – 9.

7. Ветвление древовидное – 8.

Ветвление кистевидное или многократновильчатое, конидии располагаются цепочками, гладкие, бесцветные или окрашенные, округлые. – Пенициллиум.

8. Конидиеносцы древовидно-разветвленные, большие. Ветви располагаются беспорядочно, конидии на концах ветвей развиваются кустиками, бесцветные, яйцевидные, гладкие. – Ботритис.

Конидиеносцы древовидно-разветвленные. Ветви располагаются мутовчато. Конидии образуются пачками или поодиночке, вытянуто-яйцевидные или эллипсоидальные, бесцветные или слабоокрашенные. – Вертициллиум.

9. Конидиеносцы неветвящиеся, длинные, с кустиками больших грушевидных конидий на конце. Конидии двуклеточные, бесцветные или розоватые. Колонии гриба желтоваторозовые. – Трихотециум.

Конидиеносцы и конидии иной формы – 10.

10. Конидиеносцы ветвятся. Ветвление простое, реже – вильчатое – 11.

Простые (как исключение, просто ветвящиеся) конидиеносцы имеют на конце булабовидное или пузыревидное вздутие. Иногда такое вздутие отсутствует – 12.

11. Конидии крупные, неправильной формы, усеяны бородавочками, расположены цепочками, окрашены в коричневый цвет. Колонии вначале пушистые, потом слизистые, с сильным неприятным запахом мышьяковистого водорода. – Акаулиум.

Конидии бесцветные, длинные, серпообразные, многоклеточные (с поперечными перегородками), иногда расположены цепочкой одна за другой или появляются прямо на мицелии. Дерновинки гриба окрашены в розовый цвет (особенно нижняя сторона). – Фузариум.

12. Концы конидиеносцев булабовидно или пузыревидно раздуты и покрыты стеригмами, несущими цепочки конидий – 13.

Расширение на конце часто отсутствует, стеригмы располагаются только на вершине конидиеносцев, но не растут по сторонам. Конидии мелкие, округлые, гладкие, бесцветные, на стеригмах располагаются цепочками. – Цитромицес.

13. Стеригмы, покрывающие булабовидные вздутия, простые, неветвящиеся, несут цепочки конидий. Конидии округлые, гладкие или шиповатые, окрашенные или бесцветные. – Аспергиллус.

Стеригмы ветвящиеся, образуют на пузыревидном вздутии конидиеносца два яруса. Верхний несет цепочки конидий. Конидии округлые, гладкие, окрашенные. – Стеригматостис.

14. Конидии образуются прямо на мицелии – 16.

Конидии образуются на конидиеносцах, мало отличающихся от обыкновенных вегетативных гифов – 15.

15. Конидиеносцы видны лишь при культуре «висячая капля». Конидии легко рассыпаются – 17.

Места образования конидий видны в обычном микроскопическом препарате – 18.

16. Одноклеточные конидии, бесцветные, веретеновидные или округло-удлиненные. Конидии слизистые, черные. – Дематиум. Конидии одноклеточные, яйцевидные, дрожжеобразные. Молодые колонии похожи на дрожжевые, потом становятся лохматыми. – Монилия.

17. Конидии получают простым делением мицелия и легко отпадают, бесцветные, прямоугольные, иногда соединены в короткие цепочки. – Оидиум.

Конидиеносцы длинные, многоклеточные. Конидии неправильной формы (длинные, округлые или лимонообразные), окрашены в светлый оливково-зеленый цвет. – Кладоспориум.

18. На медленно растущих колониях нет настоящих конидиеносцев. Мелкие, блестящие, желто-коричневые конидии образуются очень длинными цепочками на концах обыкновенных гифов. – Катенулария.

Крупные, многоклеточные, округло-грушевидной или заостренно-вытянутой формы конидии образуются в одиночку или короткими цепочками на коротких боковых ветвях вегетативных гифов, играющих роль конидиеносцев. – Альтернария.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7
МИКРООРГАНИЗМЫ ВРЕД или ПОЛЬЗА?!

Цель работы:

Изучить способы определения бактерий;

Познакомиться с полезными и вредными свойствами бактерий;

Обосновать необходимость гигиенических процедур.

Материалы и оборудование: чашки Петри 4 шт, питательная среда Чапека, шпатели, игла, молоко, монета, парафильм или пищевая пленка, марлевые повязки, перчатки

Ход работы:

1. Приготовить питательную среду и разлить ее по чашкам Петри,
2. В чашку Петри №1 капнуть каплю молока
3. В чашке Петри №2 оставить отпечаток не мытых рук
4. В чашке Петри №3 оставить отпечаток помытых рук
5. В чашке Петри №4 слегка дотронуться монеткой до питательной среды
6. Наблюдать за ростом микроорганизмов
7. Сделать выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8

Влияние факторов внешней среды на развитие микроорганизмов

Цель работы:

Изучить влияние факторов внешней среды (рН среды, температуры и концентрации) на развитие микроорганизмов.

Задачи:

Занятие 1

1. Сделать посев бактерий на питательных средах с различным значением рН.
2. Сделать посев бактерий на питательных средах с различной концентрацией хлорида натрия.
3. Воздействовать на спорообразующие и неспорообразующие бактерии высокой температурой и сделать их посевы.
4. Сделать посевы плесневых грибов на питательных средах и вырастить их при различных температурах.
5. Сделать посев плесневых грибов или дрожжей на питательных средах с различной концентрацией глюкозы.

Занятие 2

6. Провести оценку интенсивности роста бактерий на питательных средах с различным значением рН.
7. Провести оценку интенсивности роста бактерий на питательных средах с различной концентрацией хлорида натрия.
8. Провести оценку интенсивности роста бактерий после воздействия на них высокой температуры.
9. Из выросших культур приготовить мазки и окрасить их по Граму.

10. Промикроскопировать препарат и установить форму бактерий.

11. Провести оценку интенсивности роста и спорообразования плесневого гриба при различных температурах выращивания.

12. Провести оценку интенсивности роста плесневого гриба или дрожжей на питательных средах с различной концентрацией глюкозы.

13. Определить по ключу родовое название изучаемого плесневого гриба.

Материалы и оборудование: Стерильные пробирки, термостат, микроскоп, водяная баня, пипетки Пастера, штатив, сухое горючее, 60%-р-р глюкозы, 5%, 10%, 20%-р-ры хлорида натрия, рН метр, чашки Петри, питательная среда.

Теоретическая часть

В естественных условиях микроорганизмы подвергаются воздействию разных по своей природе факторов, которые могут как стимулировать, так и тормозить их развитие (замедлять метаболические процессы) и даже приводить их к гибели.

Температура является одним из наиболее мощных факторов, воздействующих на микроорганизмы. И хотя в целом развитие микроорганизмов происходит в очень широком диапазоне температур, для каждого конкретного вида существуют определенные температурные границы, в которых происходит их жизнедеятельность. Эта температурная зависимость характеризуется тремя точками:

– минимальной температурой развития (t_{minimum}). Это такая температура, при незначительном снижении которой скорость роста стремится к нулю ($V_{\text{роста}} \rightarrow 0$);

– оптимальной температурой развития (t_{optimum}). Это такая температура, при которой скорость роста является максимальной ($V_{\text{роста}} = \text{max}$);

– максимальной температурой развития (t_{maximum}). Это такая температура, при незначительном увеличении которой скорость роста стремится к нулю ($V_{\text{роста}} \rightarrow 0$).

В зависимости от отношения к той или иной температуре все микроорганизмы делятся на три основные группы: психрофилы, мезофилы и термофилы.

Психрофилы (греческое «психрос» – холод, «филео» – люблю) развиваются при низких температурах. Минимальной температурой развития у них является температура замерзания среды (около $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$), оптимальная – $15\ldots 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, а максимальная – $30\ldots 35\text{ }^{\circ}\text{C}$. К ним относятся обитатели холодных источников северных морей и океанов. Их часто обнаруживают на поверхности рыб. Многие из них, относящиеся к родам *Pseudomonas*, *Achromobacter*, способны быстро вызывать микробиальную порчу рыбы, хранящейся при температуре $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. К психрофилам относится большинство светящихся бактерий рода *Photobacterium*. Их развитие в морской воде вызывает ее свечение.

Мезофилы («мезос» – средний) – наиболее распространенная группа микроорганизмов, развивающихся в температурных пределах от $5\text{--}10$ до $40\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Температурный оптимум для них составляет $25\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$. К этой группе относятся многие гнилостные бактерии, вызывающие порчу пищевых продуктов при положительных температурах, а также все патогенные и токсичные формы бактерий. Вместе с тем большинство промышленных процессов (получение органических кислот, ферментов и т. д.) осуществляется с помощью мезофилов.

Термофилы («термос» – теплый) развиваются в температурных пределах от $30\text{--}35$ до $+80$ и даже до $+90\text{ }^{\circ}\text{C}$ с оптимумом $50\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Они присутствуют в почве, навозе, иле. Среди них есть как споровые, так и неспоровые бактерии. Наибольшее количество термофилов наблюдается в местах, постоянно испытывающих действие высоких температур (например, в горячих источниках).

Термофилия широко распространена среди анаэробов. В большинстве это споровые формы (например, представители рода *Clostridium*), причем споры у них отличаются особой термоустойчивостью. Поэтому они могут переносить стерилизацию и вызывать плоско-кислую порчу консервов.

Отрицательное воздействие на микроорганизмы оказывают как низкие, так и высокие температуры, но механизм их действия различен. Низкие температуры оказывают в основном бактериостатическое действие вследствие замедления протекания биохимических процессов (замедления метаболизма).

Гибель микроорганизмов (бактерицидное действие) наблюдается в случае чисто механического разрыва клеток образующимися в них кристаллами льда. Чем меньше образующиеся кристаллы льда и чем равномернее они распределены в клетке, тем меньше гибель микроорганизмов. И наоборот, чем крупнее кристаллы, тем больше клеток погибнет. Поэтому наиболее губительны для микроорганизмов температуры, которые соответствуют криоскопической точке цитоплазмы (от -2 до $-5,6$ °C).

Чем дальше температура отстоит от криоскопического значения, тем меньше гибель микроорганизмов.

Наиболее губительны для микроорганизмов высокие температуры. Повышение температуры приводит к ускорению биохимических реакций, но скорость реакций в клетке изменяется непропорционально, что приводит к дисбалансу и нарушению протекания метаболических процессов.

Высокие температуры ($70-80$ °C и выше) оказывают бактерицидное действие. Под их воздействием происходит денатурация белка, приводящая к нарушению проницаемости клеточных стенок, потере активности ферментов, изменению структуры цитоплазмы и, как следствие всего этого, гибели клетки.

Разные группы микроорганизмов проявляют разную чувствительность к действию высоких и низких температур. Наиболее чувствительны к действию низких температур термофилы и мезофилы, а к действию высоких – психрофилы и мезофилы. Наибольшей устойчивостью к действию высоких температур обладают споры. Воздействие высоких температур широко используется для подавления развития микроорганизмов.

Реакция среды pH определяется концентрацией ионов водорода. Хотя в целом микроорганизмы развиваются в очень широком диапазоне pH, каждой физиологической группе и даже отдельным видам соответствуют определенные значения pH (оптимальная зона pH), в пределах которых происходит их развитие. Плесневые грибы, дрожжи и бактерии рода *Acetobacter* лучше всего развиваются в кислой среде при $\text{pH} = 3\text{--}5$. Такие микроорганизмы называются ацидофильными.

Для большинства бактерий наиболее благоприятна нейтральная или слабощелочная среда с оптимумом pH 7,0–7,3. Изменение pH в кислую сторону губительно отражается на гнилостных бактериях. Наоборот, уксуснокислые бактерии к кислой среде устойчивы.

Особенно чувствительны к изменению реакции среды азотфиксирующие бактерии, в частности азотобактер. Он лучше всего развивается при pH 7,4–7,6, поэтому в кислых почвах его практически нет. Клубеньковые бактерии тоже лучше развиваются при слабощелочной реакции среды, хотя зона pH, при которой они могут развиваться, значительно шире, чем у азотобактера.

Влияние pH на развитие микроорганизмов основано на том, что реакция среды влияет на активность ферментов, так как каждый фермент проявляет свою активность только при определенных значениях pH. От концентрации ионов водорода зависит также поступление питательных веществ внутрь клетки и физическое состояние белков. Так, денатурация и выпадение большинства белков в осадок под действием высоких температур наиболее быстро и полно происходит в слабокислой среде. Увеличение кислотности среды наряду с температурой

широко используется для подавления развития микроорганизмов при консервировании пищевых продуктов.

Ход работы:

Занятие 1

1. Провести посев бактерий на питательные среды с различным значением pH.

Посев проводят в четыре пробирки на МПА (агар) с различным значением pH: в одной из них pH равно 3, во второй – 5, в третьей – 7 и в четвертой – 9. Перед началом посева каждую пробирку подписывают: указывают значение pH и ставят свой номер.

Для посева используют бактерии или из чистой бульонной культуры, или из плотной питательной среды. Посев производят бактериальной петлей или бактериальной иглой с соблюдением правил асептики. При посеве на плотную среду пользуются иглой, а на жидкую – петлей.

Петлю или иглу стерилизуют перед каждым посевом в пламени сухого горючего (фламбирование). После посева пробирки с засеянными средами помещают в штатив и ставят в термостат.

Термостатирование проводят в течение 24–48 ч при температуре 37 °С. После этого выращенные культуры микроорганизмов переставляют в холодильник и хранят там до следующего занятия.

2. Провести посев бактерий на питательные среды с различной концентрацией хлорида натрия.

Посев проводят в четыре пробирки на питательную среду с различной концентрацией хлорида натрия: 5, 10, 20% и без него (контрольный посев). Все пробирки предварительно подписывают и нумеруют. Посевы проводят бактериальной петлей, которую каждый раз стерилизуют в пламени спиртовки.

Пробирки с засеянными средами помещают в штатив и ставят в термостат. Посевы термостатируют в течение 24 ч при температуре 37 °С. После этого выращенные культуры переставляют в холодильник и хранят там до следующего занятия.

3. Провести посев бактерий на косой агар после воздействия на них высокой температуры.

Сначала готовят взвеси из культур бактерий, образующих и не образующих споры. Для этого берут две пробирки со стерильным изотоническим раствором. В одну вносят культуру сенной палочки (образует споры), а во вторую – молочнокислого стрептококка (не образует споры). Обе пробирки помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. После кипячения пробирки охлаждают и из каждой делают посев при помощи петли на косой агар. Перед каждым посевом петлю стерилизуют.

Пробирки с посевами подписывают, указав культуру, которая в них посеяна, и свой номер, помещают в штатив и ставят в термостат. Посевы термостатируют 24 ч при температуре 37 °С.

После этого выращенные культуры переставляют в холодильник и хранят там до следующего занятия.

4. Провести выращивание плесневых грибов при различных температурах.

Посеять споры плесневого гриба в три чашки Петри на сусло-агар (СА) или среду Сабуро с агаром. Предварительно готовят водяную суспензию спор. Для этого берут культуру плесневого гриба со зрелыми органами размножения (конидиями или спорангиями) и проводят по ним бактериальной петлей, предварительно смоченной в воде (чтобы споры лучше к ней прилипали). Затем вносят петлю в стаканчик или пробирку с водой (переноса туда споры) и тщательно перемешивают.

Переносить споры в пробирку можно несколько раз.

После этого стерильной бактериальной петлей берут каплю водяной суспензии спор плесневого гриба и осторожно наносят ее на СА, прикасаясь ребром петли в центр каждой чашки.

При повторных посевах петлю можно не стерилизовать. Все чашки необходимо подписать, указав на каждой из них температуру выращивания, и поставить свой номер. Все надписи делаются только на дне чашек.

Засеянные чашки переворачивают вверх дном и ставят посеvy на выращивание. Выращивание микроорганизмов при температурах 5 °С проводят в холодильнике, а при температуре 25 °С – в комнатных условиях, недалеко от батарей центрального отопления (при этом чашки надо накрыть темным материалом, чтобы на них не попадал свет), при 40 °С – в термостате. Через 48–72 ч все чашки переставляют в холодильник и хранят там до следующего занятия.

4.5. Провести посев плесневых грибов или дрожжей на питательные среды с различной концентрацией глюкозы.

Посев проводят в четыре пробирки на пивное сусло или среду Сабуро с 20, 40 и 60%-ой концентрацией глюкозы и без нее (контрольный опыт). Все пробирки предварительно подписывают, указав концентрацию глюкозы и поставив свой номер.

Для посева используют суспензию спор плесневого гриба, приготовленную для предыдущего опыта. Кроме этого, готовят суспензию дрожжей. Для этого небольшое количество сухих дрожжей помещают в стаканчик или пробирку с водой и тщательно перемешивают. Посевы проводят стерильной бактериальной петлей или микропипеткой.

Пробирки с засеянными средами ставят в штатив и помещают в термостат, где их термостатируют в течение 48 ч при температуре 25 °С. В случае необходимости можно на это же время оставить пробирки на столике вблизи батареи центрального отопления. При этом предварительно они должны быть тщательно закрыты плотным темным материалом, не пропускающим свет. Через двое суток выращенные культуры переставляют в холодильник и хранят там до следующего занятия.

Занятие 2

Выполненные на предыдущем занятии посеvy достают из холодильника и проводят их анализ.

1. Провести оценку роста бактерий на средах с различными значениями pH.

Интенсивность роста бактерий на средах с различными значениями pH определяется по степени мутности среды. Перед этим содержимое каждой пробирки, на которой был проведен посев на предыдущем занятии, тщательно перемешивают (вращая пробирки между ладонями) и затем сравнивают друг с другом.

2. Провести оценку роста бактерий на средах с различной концентрацией NaCl и без нее.

Интенсивность роста бактерий, как и в предыдущем опыте, определяется по степени мутности среды. Для ее проведения содержимое каждой пробирки тщательно перемешивают и сравнивают его с содержимым других пробирок, определяя степень мутности, которая оценивается визуально и обозначается следующим образом: отсутствие роста (–); слабый рост (+); умеренный рост (++); обильный рост (+++).

3. Провести оценку роста бактерий после воздействия на них высокой температуры.

Действие высоких температур на спорообразующие и неспорообразующие бактерии определяют по характеру роста микроорганизмов на косом агаре (сплошной, в виде отдельных колоний или обильный, слабый, умеренный, отсутствие роста).

4. Приготовить мазки, окрасить их по Граму и промикроскопировать.

Для распознавания изучаемых бактерий (микрококки, сарцины, бациллы или неспороносные палочки) из двух пробирок с pH 7 и нулевой концентрацией соли готовят мазки, высушивают и фиксируют их, а затем окрашивают по Граму и микроскопируют с увеличением объектива 90х или 100х. Увиденное под микроскопом зарисовывают в тетрадь и формулируют выводы.

5. Провести оценку роста плесневого гриба, растущего при разных температурах.

Показателями влияния температуры на рост плесневых грибов служат величина колоний и интенсивность их спороношения. Для определения этих показателей чашки Петри, на которых росли грибы, переворачивают и со стороны дна чашки измеряют при помощи линейки диаметр выросших при разной температуре колоний. Полученные результаты записывают в табл. 4 и делают выводы.

Для оценки интенсивности спороношения, как и в предыдущих опытах, пользуются следующими условными обозначениями: спороношение отсутствует (–); спороношение слабое (+); спороношение умеренное (++); спороношение сильное, или обильное (+++). Полученные данные заносят в табл. 4 и делают выводы о влиянии различных температур на рост и спороношение плесневого гриба.

5. Определить родовое название гриба

Для определения родового названия выросшего гриба готовят препарат типа «раздавленная капля» и микроскопируют его. Препарат готовят обычным способом.

Внимание! Для того чтобы органы размножения грибов не нарушились и споры не осыпались, кусочек мицелия берут очень аккуратно на границе участка с заметным спороношением.

Приготовленный препарат микроскопируют на увеличение объектива 10х. При микроскопировании надо найти и зарисовать органы размножения гриба и по ключу определить его родовое название.

6. Провести оценку роста плесневого гриба и дрожжей, растущих при различной концентрации глюкозы.

Влияние концентрации глюкозы в среде на рост плесневого гриба определяют по интенсивности развития мицелия и спорообразования. Для этого просматривают пробирки с посевами, сделанными на предыдущем занятии, и сравнивают их друг с другом. При сравнении полученных результатов пользуются условными обозначениями: отсутствие роста или спорообразования (–); слабый рост или спорообразование (+); умеренный рост или спорообразование (++); обильный рост

или спорообразование (+++). Полученные данные заносят в табл. 5 и формулируют выводы.

Интенсивность развития дрожжей на средах с различной концентрацией глюкозы определяется по степени мутности сусл. Перед определением содержимое каждой пробирки, на котором был проведен посев на предыдущем занятии, тщательно перемешивают (вращая пробирку между ладонями) и затем сравнивают ее с содержимым других пробирок. Интенсивность развития дрожжей по мутности среды характеризуют, используя указанные выше условные обозначения. Полученные данные заносят в табл. 5 и делают выводы.

Определение родового названия изучаемого гриба ведут так, как указано в приложение 2.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9

Изучение морфологии дрожжей

Цель работы:

Ознакомиться с морфологическими особенностями грибов и дрожжей, встречающихся при производстве пищевых продуктов. Освоить технику микроскопического исследования грибов и дрожжей в препаратах «раздавленная капля».

Материалы и оборудование: Микроскоп; пипетка, шпатели, препаровальные иглы и бактериологические петли; предметные и покровные стекла; фильтровальная бумага; спиртовка; поднос для предметных стекол; чистая культура дрожжей, марлевые повязки, перчатки, парафильм или пищевая пленка.

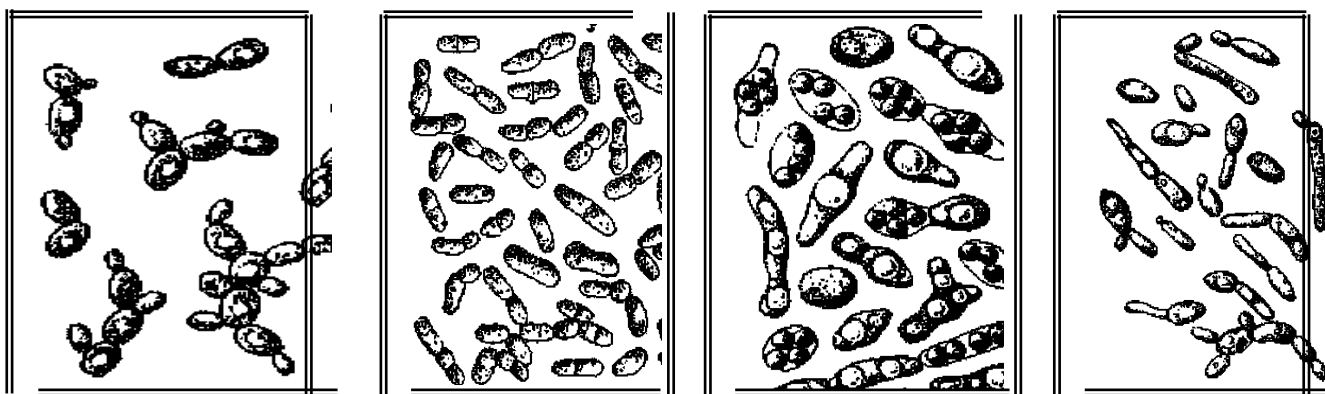
Теоретическая часть:

Морфология дрожжей и их характеристика

Дрожжи – это высшие одноклеточные грибы. Большинство дрожжей относится к двум классам грибов – аскомицетам и дейтеромицетам.

Дрожжи по отношению к кислороду делятся на факультативные анаэробы (в аэробных условиях осуществляют дыхание и активно накапливают биомассу, а в анаэробных условиях вызывают спиртовое брожение) и аэробы.

Морфологически дрожжи разнообразны. Они отличаются друг от друга размерами и формой клеток. Размеры клеток дрожжей в зависимости от вида варьируют в следующих пределах; от 2,5 до 10 мкм в поперечнике и от 4 до 20 мкм в длину. Морфологическое разнообразие форм дрожжей изображено на рис. 6.

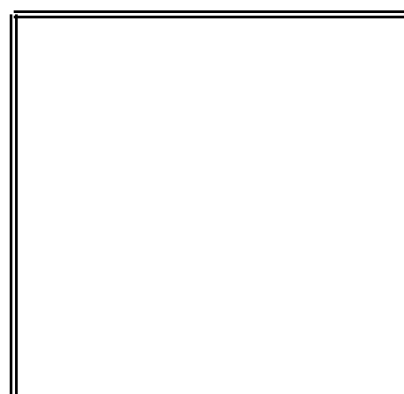
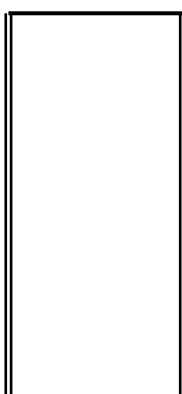
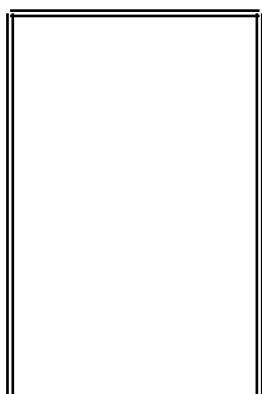
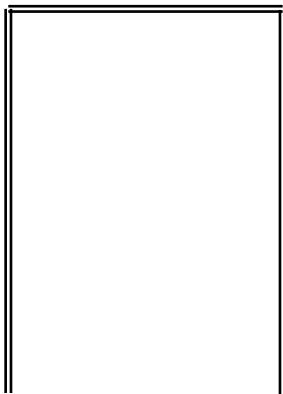


а

б

в

г



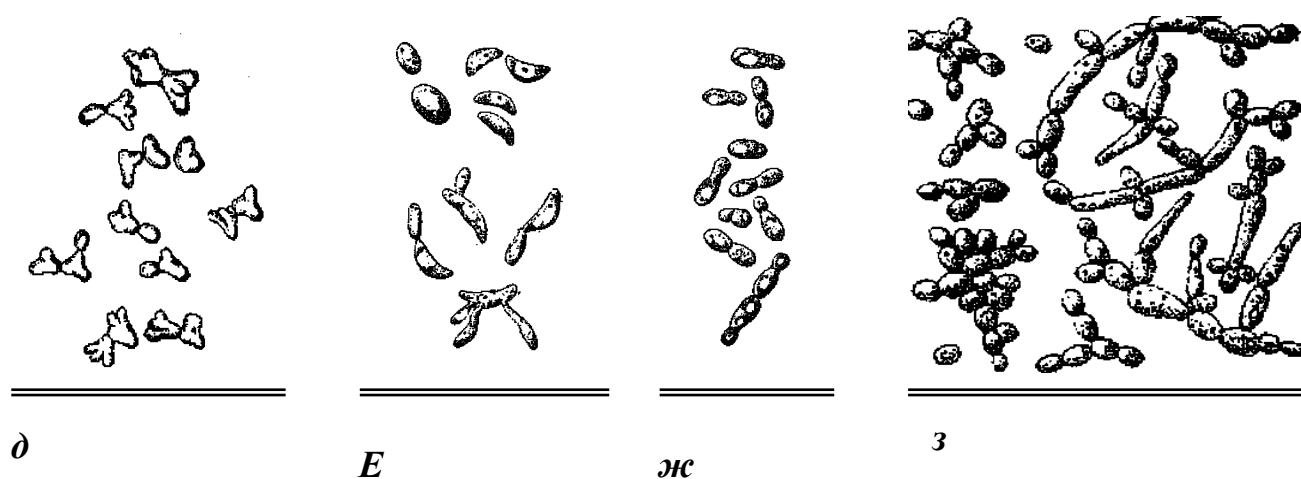


Рис. 6 Формы дрожжевых клеток: а - овальная яйцевидная; б - цилиндрическая; в - апикулятная; лимоновидная; г - стреловидная; д - треугольная; е - серповидная; ж - колбовидная; з, и - мицелиевидная

Форма и размеры дрожжевых клеток зависят от вида, возраста, питательной среды, способа культивирования.

В зависимости от вида дрожжи вегетативно могут размножаться почкованием (так размножаются дрожжи овальной формы), бинарным делением (характерно для дрожжей цилиндрической или палочковидной формы) или почкующимся делением. Кроме вегетативного размножения, дрожжи – аскомицеты могут размножаться половым путем с образованием аскоспор.

Из дрожжей, относящихся к классу аскомицетов, большое значение имеют дрожжи-сахаромицеты рода *Saccharomyces*, которые широко используются в пищевой промышленности. Главным биохимическим признаком этих дрожжей является то, что они сбраживают сахара с образованием этилового спирта и диоксида углерода. Дрожжи, используемые в промышленности, называются *культурными дрожжами*. Так, в хлебопекарном производстве и в производстве спирта используются верховые дрожжи рода *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи вида *Saccharomyces minor* нашли применение в производстве ржаного хлеба и кваса. В пивоварении используются низовые дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis*. Дрожжи-сахаромицеты имеют овальную форму, вегетативно размножаются почкованием, в неблагоприятных условиях размножаются половым путем аскоспорами.

Некоторые спорогенные дрожжи являются *дикими дрожжами*. Эти дрожжи так же, как и культурные, способны осуществлять спиртовое брожение, но помимо спирта образуют много побочных продуктов (таких как альдегиды, высшие спирты, эфиры и др.) и поэтому ухудшают органолептические показатели продукта. Эти дрожжи являются вредителями производства различных напитков (пива, вина, безалкогольных напитков), а также возбудителями порчи многих пищевых продуктов.

Дрожжи - дейтеромицеты могут размножаться только вегетативным способом. Некоторые из этих дрожжей (например, дрожжи рода *Candida*) используются в промышленности для получения кормового белка, органических кислот, витаминов и других продуктов микробного синтеза. Дрожжи вида *Torulopsis kefir* входят в

состав симбиотической закваски – кефирного грибка. Другие представители несовершенных (аспорогенных) дрожжей являются дикими дрожжами и вызывают порчу многих пищевых продуктов. К дрожжам- вредителям производства относятся дрожжи родов *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torula*, *Torulopsis*, *Mycoderma*, *Trichosporon* и др. Среди аспорогенных дрожжей встречаются *ложные дрожжи*, которые образуют псевдомицелий и растут на жидких субстратах в виде пленок.

Ход работы:

На занятии учащиеся изучают морфологические признаки грибов и дрожжей, их культуральные свойства, знакомятся с представителями отдельных классов. Осваивают методику приготовления препаратов «раздавленная капля» и технику микроскопирования живых неокрашенных объектов.

Приготовление препаратов типа «раздавленная капля»

При исследовании дрожжей на предметное стекло наносят суспензию дрожжей, накрывают покровным стеклом, излишки воды удаляют фильтровальной бумагой. Микроскопируют препарат и объективом x8 и x40.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №10

Изучение культуральных свойств выросших в чашках колоний

Цель работы:

Изучить культуральные свойства выросших колоний

Материалы и оборудование: Чашки Петри, среда Чапека, стерильные шпатели, пипетки, лупа, штатив, петля, перчатки, марлевые повязки, парафильм или пищевая пленка.

Ход работы:

- 1) Вырастить методом Коха колонии микроорганизмов.
- 2) Рассмотреть выросшие колонии в проходящем свете невооруженным глазом (макроскопически) и с помощью лупы описать следующее:

1. Форму колоний

Формы колоний, которые могут вырасти на плотной среде в чашках Петри, изображены на рис. 7.

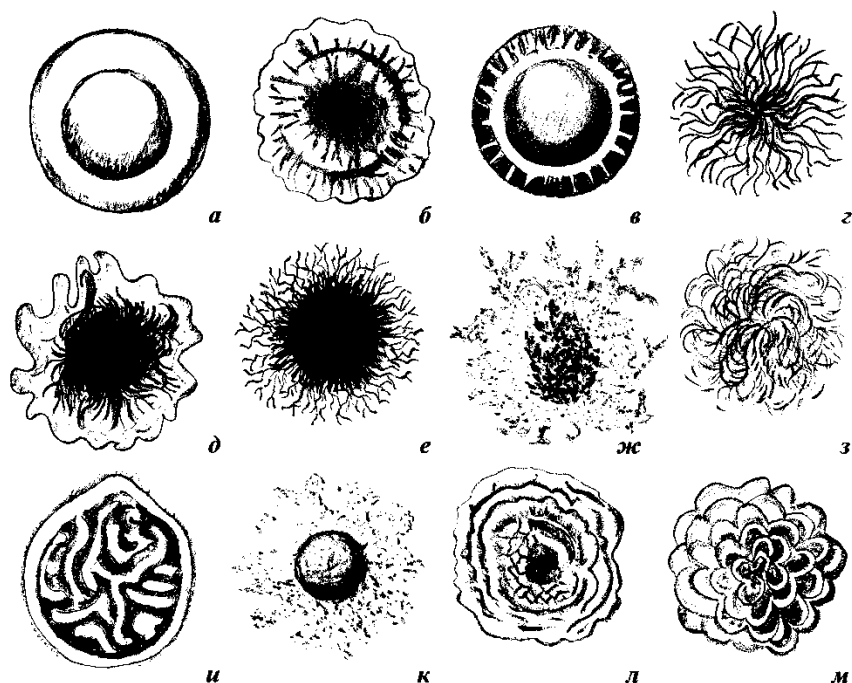


Рис.7 Форма колоний: *а – круглая; б – круглая с фестончатым краем; в – круглая с валиком по краю; г; д – ризоидная; е – с ризоидным краем; ж – амёбовидная; з – нитевидная; и – складчатая; к – неправильная; л – концентрическая; м – сложная*

Форма колоний может быть круглой, неправильной, корневидной, эллипсовидной и т.д.

2. Размеры колоний

Колонии, имеющие диаметр более 4 мм являются крупными, от 2 до 4 мм – средними, от 1 до 2 мм – мелкими, менее 1 мм - точечными или росинчатыми.

3. Цвет колоний

Микроорганизмы, содержащие пигменты могут быть желтого, оранжевого, розового, кремового и др. цветов. Большинство микроорганизмов не содержат пигментов и растут на плотных средах в виде серовато-матовых колоний. Такие колонии называют бесцветными.

4. Рельеф (профиль) колоний

Рельеф или профиль колоний может быть плоским, выпуклым, куполообразным, смешанным - плоским с выпуклым центром, кратерообразным и др. (рис. 8).



Рис. 8 Профиль колоний: *а – изогнутый; б – кратерообразный; в – бугристый; г – врастающий в агар; д – плоский; е – выпуклый; ж – каплевидный; з – конусовидный*

5. Поверхность колоний

Поверхность колоний может быть гладкой, блестящей, шерховатой, морщинистой, извилистой и т.д.

6. Характер края колоний

Разновидности края колоний изображены на рис. 9.

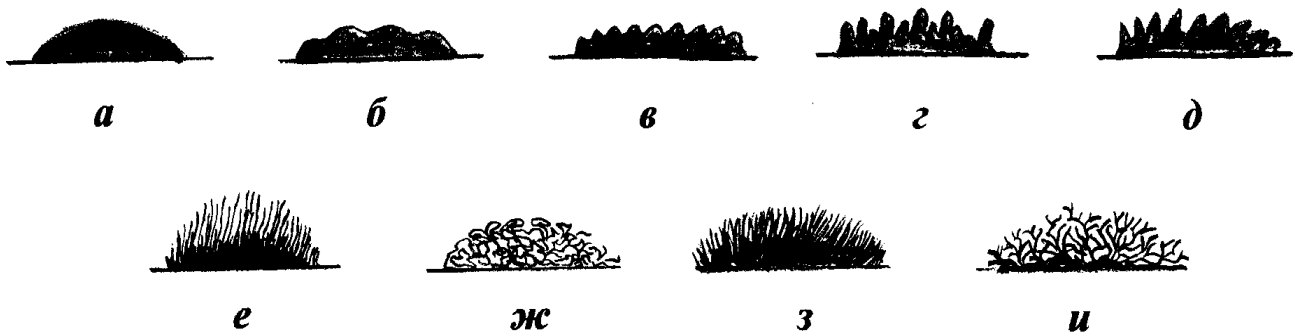


Рис.9 Край колоний: *а* - гладкий; *б* – волнистый; *в* – зубчатый;
г – лопастный; *д* – неправильный; *е* – реснитчатый;
ж – нитчатый; *з* – ворсинчатый; *и* - ветвистый

Край может быть ровным (гладким); волнистым; локонообразным (нитчатым); лопастным; бахромчатым; зазубренным; корневидным (ветвистым) и др.

7. Прозрачность колоний

Колонии бывают прозрачные, полупрозрачные и непрозрачные.

8. Структуру колоний

Структура колоний бывает однородная (гомогенная) и неоднородная (гетерогенная). Неоднородные колонии могут быть мелко- и крупнозернистыми, радиально или концентрически исчерченными, чешуйчатыми и др.

9. Консистенцию колоний

Определяется при приготовлении препаратов для микроскопического анализа.

Сделать выводы

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11

Выращивание микроорганизмов

Цель работы:

Вырастить уникальные образцы микроорганизмов

Бактерии увлекательный вид микроорганизмов, которые играют большую роль в нашей жизни, хотим мы этого или нет. Попробуйте вырастить ваши собственные образцы бактерий, наблюдая, как они воспроизводятся в короткий промежуток времени. Сравните ваши оригинальные образцы с другими людьми и получить доказательства того, что бактерии действительно есть везде!

Материалы и оборудование: Чашки Петри, питательная среда, ватные тампоны, парафильм или пищевая пленка, марлевые повязки, перчатки

Ход работы:

1. Приготовьте чашку Петри с небольшим количеством питательной среды.
2. Используйте ватный тампон на определенной территории вашего дома (т.е. необходимо взять образец, протирая ватным тампоном поверхность по вашему выбору).
3. Стряхните тампон над чашкой, прежде чем положить крышку на место и загерметизируйте чашку парафильмом.
4. Поместите чашку в теплое помещение в течение на 2 или 3 дня.
5. Проверяйте рост бактерий каждый день, делая рисунки, фотографии и описание изменений.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №12

Выращивание своих собственных микроорганизмов

Цель работы:

Вырастить уникальные образцы своих собственных микроорганизмов

Бактерии увлекательный вид микроорганизмов, которые играют большую роль в нашей жизни, хотим мы этого или нет. Попробуйте вырастить ваши собственные образцы бактерий, наблюдая, как они воспроизводятся в короткий промежуток времени. Сравните ваши оригинальные образцы с другими людьми и получить доказательства того, что бактерии действительно есть везде!

Материалы и оборудование: Чашки Петри, питательная среда, ватные тампоны, парафильм или пищевая пленка, перчатки, марлевая повязка, штатив.

Ход работы:

1. Приготовьте чашку Петри с небольшим количеством питательной среды.
2. Используйте ватный тампон по руке (т.е. необходимо взять образец, протирая ватным тампоном поверхность по вашему выбору).
3. Стряхните тампон над чашкой, прежде чем положить крышку на место и загерметизируйте чашку парафильмом.
4. Поместите чашку в теплое помещение в течение на 2 или 3 дня.
5. Проверяйте рост бактерий каждый день, делая рисунки, фотографии и описание изменений.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №13

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Цель работы:

Определить чувствительность микроорганизмов к антибиотикам.

Материалы и оборудование: чашка Петри 4шт, питательная среда Чапека, агар, шпатели, иглы, парафильм или пищевая пленка, антибиотики, марлевые повязки, перчатки.

Практическая часть:

1. Приготовить питательную среду и разлить ее по чашкам Петри, накрыть пленкой до опыта.
2. Чашку Петри №1, 2 оставить в туалете на 15 мин
3. В чашке Петри №3, 4 оставить отпечаток не мытых рук
4. Наблюдать за ростом микроорганизмов
5. Чашки № 1, 3 оставить без изменений и наблюдать за дальнейшим ростом микроорганизмов (контроль)
6. В чашках Петри №2, 4 на колонии бактерий нанести с помощью пипетки антибиотики и оставить для дальнейшего роста микроорганизмов.
7. Сравнить чашки № 1 и №2; №3 и №4.
8. Сделать выводы.

РАЗДЕЛ ЦИТОЛОГИИ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 14

Изучение плазмодесмы в клетках эндосперма хурьмы

Цель работы:

Изучение плазмодесмы в клетках эндосперма хурьмы

Материалы и оборудование: микротом, чашка Петри, предметные и покровные стекла, пинцет, микроскоп

Ход работы:

Плазмодесмы в оболочках клеток запасающей ткани семени хурьмы (*Diospyros Kaki Thunb.*) Клетки эндосперма в очертании многоугольные, соединены плотно, без межклетников. Клетки имеют очень толстые оболочки, между которыми обычно хорошо заметны межклеточные пластинки. Толщина оболочек обусловлена мощным отложением в них гемицеллюлозы как вещества запаса. Во многих клетках видны пересекающие оболочки группы тонких канальцев с плазмодесмами, соединяющими протопласты соседних клеток.

1. Для приготовления препарата пригодны свежие и хранящиеся в глицерине семена. Сняв кожуру, сделать тонкий поперечный срез запасающей ткани (эндосперма), положить его в каплю раствора йода в водном растворе йодида калия
2. Накрыть покровным стеклом и рассмотреть при малом и большом увеличении микроскопа.
3. Зарисовать несколько клеток, на рисунке обозначить содержимое клетки, клеточную стенку плазмодесмы.
4. Сделать выводы о плазмодесмах эндосперма хурьмы

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 15

Молодые клетки зачатка листа

Цель работы:

Изучить молодые клетки зачатка листа

Материалы и оборудование: микротом, предметное и покровное стекло, микроскоп, лупа, пипетка, препаровальная игла,

Ход работы:

1. Приготовить временный препарат зачатка листа. Для приготовления препарата верхушку побега (не более 1 см длиной) положить на предметное стекло в большую каплю воды и осторожно под микроскопом или лупой двумя препаровальными иглами удалить крупные листья.
2. Самые мелкие чешуевидные листья, скученные на верхушке побега, оторвать от стебля, расправить, накрыть покровным стеклом и рассмотреть при малом, а затем при большом увеличении микроскопа.
3. Зарисовать молодую и развивающуюся клетку. Сделать подписи к рисункам.
4. Описать различия молодой и развивающейся клетки.
5. Сделать выводы о молодых клетках

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 16

Живые клетки чешуи лука

Цель работы: Изучить и рассмотреть живые клетки чешуи лука

Материалы и оборудование: микроскоп, предметные стекла, покровные стекла, пипетка, пинцет

Ход работы:

1. Приготовить временный препарат чешуи лука.
2. Рассмотреть препарат в воде под покровным стеклом при малом и большом увеличении.
3. Зарисовать клетки эпидермиса внутренней чешуи луковичы лука: общий вид и плазмализированные клетки.
4. Сделать подписи к рисунку. Описать препарат.
5. Сделать выводы

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 17**Строение зрелого листа элодеи****Цель работы:**

Изучить внешнее и внутреннее строение зрелого листа элодеи

Материалы и оборудование: предметные стекла, покровные стекла, микротом, пипетка, микроскоп, препаровальные иглы.

Ход работы:

1. Ознакомиться с общим планом строения листа, более детально рассмотреть особенности слагающих его клеток при большом увеличении.
2. Приготовить временный препарат сформированного листа элодеи.
3. Оторванный от стебля лист положить нижней стороной в каплю воды на предметное стекло, накрыть покровным стеклом и рассмотреть при малом и большом увеличении микроскопа.
4. Лист элодеи значительно больше поля зрения микроскопа, поэтому даже при работе с малым увеличением препарат приходится передвигать.
5. Зарисовать и описать препарат. Сделать подписи к рисункам.
6. Сделать выводы о строении листа элодеи

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 18

Биологические мембраны. Плазмолиз

Цель работы:

Изучить биологические мембраны

Материалы и оборудование: пробирки, пипетка, покровные и предметные стекла, микроскоп, микротом, спирт, глицерин, раствор сахарозы, уксус, свекла

Ход работы:

1. Рассмотреть рисунок биологической мембраны.
2. Зарисовать схему строения.
3. Проведите исследование характеристик плазмолиза растительных клеток в растворах различных веществ. На два предметных стекла нанести по капле раствора: на одно – 1 М раствор сахарозы, на другое 1 М раствор глицерина.
4. В каждую каплю поместить по фрагменту окрашенного эпидермиса лука, накрыть покровными стеклами и рассмотреть под микроскопом.
5. Найти участки с плазмолизированными клетками. Отметить время начала плазмолиза.
6. Рассмотреть препараты через 10–30 мин. В растворе сахарозы наблюдается стойкий плазмолиз, а в растворе глицерина временный. Причиной деплазмолиза в растворе с глицерином является проницаемость плазмалеммы для молекул глицерина.
7. На основе анализа результатов экспериментов выявить различия в продолжительности сохранения плазмолизированного состояния, вызванном различными осмолитиками, и сделать вывод об относительной проницаемости плазмалеммы для исследуемых веществ.
8. Определить влияние температуры, а также кислот и спиртов на проницаемость клеточных мембран для бетацианина по его выходу в наружный раствор.
9. Корнеплоды свеклы разрезать на брусочки, длиной 2-3 см.
10. Тщательно промыть их под водопроводной водой. Вырезать из свеклы кусочки размером 1х2 см, промыть их.

11. Опустить кусочки в пробирки с разными растворами: а) водопроводной водой (контроль); б) с кипящей водопроводной водой; в) с 30% уксусной кислотой. г) со спиртом
12. Опыт объяснить и записать результаты. Из проведенных опытов сделать вывод о свойствах проницаемости мембран.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 19

Строение лейкопластов

Цель работы: Изучить строение лейкопластов

Материалы и оборудование: микроскоп, микротом, пипетки, покровные и предметные стекла, листья традесканции, раствор сахарозы

Ход работы:

1. Приготовить временный препарат листа традесканции и рассмотреть клетки имеющие лейкопласты.
2. С верхней или нижней стороны линейного листа традесканции снять эпидермис.
3. Положить эпидермис на предметное стекло в каплю 2М раствор сахарозы.
4. Накрыть покровным стеклом и рассмотреть при малом и большом увеличении микроскопа.
5. Зарисовать и описать препарат. Сделать подписи к рисункам.
6. Сделать вывод о микроскопическом строение двумембранных органелл.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 20

Крахмальные зерна

Цель работы: Изучение крахмальных зерен картофеля

Материалы и оборудование: микротом, микроскоп, картофель, предметные покровные стекла, пипетка, чашка Петри, йод

Ход работы:

1. Рассмотреть и зарисовать зерна крахмала в клетках клубня картофеля.
2. Отрезать маленький кусочек клубня картофеля и сделать им мазок на предметном стекле в капле воды.
3. При этом из разрушенных клеток в воду переходят крахмальные зерна, в результате чего она мутнеет. Каплю накрыть покровным стеклом и рассмотреть при малом и большом увеличении.
4. При большом увеличении хорошо видны овальные и яйцевидные зерна крахмала с эксцентрической слоистостью.
5. При рассмотрении слоистости следует прикрыть диафрагму конденсора и слегка вращать микрометрический винт. Найти и зарисовать простые, сложные и полусложные крахмальные зерна.
6. Провести качественную реакцию на крахмал с помощью йода, положив кусочек картофеля на чашку Петри и капнуть йод. Отметить изменения
7. Сделать выводы

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 21

Методы обнаружения белков

Цель работы:

Ознакомиться с методами обнаружения белков и их физико-химическими свойствами.

Материалы и оборудование: зародыши гороха и пшеницы, 7% раствор CuSO_4 покровные и предметные стекла, фильтровальная бумага, 30% раствор NaOH или KOH , Дистиллированная вода, 0,5—1% водный раствор нингидрина, 5% раствор три- хлоруксусной кислоты, 1%-ного раствора яичного белка, 96% этилового спирта или ацетона, концентрированная серная или соляная кислота, сульфосалициловая кислота, трихлоруксусная кислота, 5% раствор хлорного железа, 5% раствор уксуснокислого свинца, 7%раствор сернокислой меди.

Ход работы:

1. Провести биуретовую реакцию для выявления в молекулах белков пептидных связей. Объекты помещают на 5–15 мин в 7%-ный медный купорос в часовом стекле.
2. Отсасывают раствор фильтровальной бумагой. Объекты промывают в воде и переносят их на предметное стекло в каплю 30%-ного раствора NaOH или KOH на 10–40 мин до появления окраски.
3. Провести нингидриновую реакцию на аминокруппы. Реакцию проводят в двух вариантах: с предобработкой материала и без предобработки трихлоруксусной кислотой в течение 10–15 мин. и последующей промывкой водой.
4. Подогревают до появления синей окраски. Окраска свидетельствует о присутствии аминокруппы. Сохранение окраски объекта после обработки кислотой указывает на выявление аминокруппы белка.
5. Окрашенное соединение (синее, фиолетовое) возникает после присоединения азота аминокислоты к нингидрину. Реакция без предобработки выявляет все аминокруппы как белка, так и свободных аминокислот.
6. Осаждение белка при нагревании.
7. В пробирку налить 0,5мл 1%-ного раствора яичного белка.

8. Содержимое пробирки нагреть над пламенем спиртовки и наблюдают появление опалесценции (помутнение раствора). Объяснить, с чем связано осаждение белка.
9. Осаждение белков: Осаждение белка органическими растворителями: К 5 каплям 1%-ного раствора яичного белка добавить 20–25 капель 96%-ного этилового спирта или ацетона и 1 каплю насыщенного раствора хлористого натрия.
10. Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами: В пробирку накапать 10–15 капель концентрированной азотной кислоты и, наклонив ее под углом 45° , осторожно, по стенке пробирки добавить из пипетки равный объем 1%-ного раствора какого-либо белка.
11. То же можно проделать, взяв вместо азотной кислоты концентрированную серную или соляную кислоты.
12. Осаждение белка некоторыми органическими кислотами: К 0,5мл раствора яичного белка добавить 1–2 капли 10%-ного раствора сульфосалициловой кислоты. То же проделать с 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты.
13. Осаждение белка солями тяжелых металлов. В три пробирки налить по 0,5 мл 1%-ного раствора яичного белка и добавить в первую 1 каплю 5%-ного раствора хлорного железа, во вторую – 1 каплю 5%-ного раствора уксуснокислого свинца, в третью – 1 каплю 7%-ного раствора сернокислой меди.
14. К такой же порции белка прибавить вначале 1 каплю раствора соли тяжелого металла, а затем еще 5–6 капель. Пронаблюдать ход реакций и объяснить.
15. На основании проведенных опытов сделать выводы о физико–химических свойствах белков.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 22

Методы обнаружения углеводов

Цель работы:

Обнаружить запасные сахара в различных растительных объектах и определить их принадлежность к определенной группе углеводов.

Материалы и оборудование: Морковь, картофель, 1 М раствор сахарозы, 20% HCl, раствор Фелинга, 30-50% раствор альдозы 46 или глюкозы, микротом, чашка Петри, электроплитка, Фильтровальная бумага, Пробирки и воронка, Стеклянная палочка, Спиртовка с держателем, Раствор йодида калия, Раствор L-нафтола в 96%-ном этиловом спирте, Серная кислота, пробирки

Ход работы:

1. Реакции на сахара обычно проводят на свежем материале. Провести йодную реакцию на крахмал. Срезы картофеля не должны быть тонкими, чтобы можно было выбрать неповрежденные слои клеток для исследования. Для наблюдения реакции используют раствор йода в йодиде калия. На объект, находящийся на предметном стекле, наносят каплю реактива и накрывают покровным стеклом. Реактив действует моментально, окрашивая крахмал в сине- фиолетовый цвет.
2. Провести реакцию с L-нафтолом на простые и сложные углеводы. Объект помещают на предметное стекло в раствор L-нафтола в 96%-ном этиловом спирте, добавляют две капли серной кислоты и накрывают покровным стеклом. При наличии глюкозы быстро появляется фиолетовая окраска. Если реакция наблюдается через 30–45 мин, то это свидетельствует о том, что под действием кислоты другие углеводы превратились в глюкозу. Данная реакция не является специфичной.
3. Качественные реакции с раствором Фелинга. Провести контрольную реакцию раствора Фелинга с раствором альдозы (глюкозы, галактозы): 30-50% раствор альдозы (1-2 мл) смешать с таким же объемом раствора Фелинга и нагреть до кипения.

4. Провести такую же реакцию с сахарозой. Раствор сахарозы смешать с 2-3 каплями 20% соляной кислоты, прокипятить в течение 1 минуты, добавить равный объем раствора Фелинга и прокипятить.
5. Результаты записать в тетради и объяснить.
6. Нарезать мелко растительный материал, (морковь и т.д.), добавить немного воды и нагревать на водяной бане в течение 5 минут. Профильтровать.
7. Половину фильтрата смешать с раствором Фелинга и нагреть до кипения.
8. Вторую половину фильтрата смешать с 2-3 каплями 20% соляной кислоты, затем, после гидролиза сахарозы, провести реакцию Фелинга.
9. Сделать выводы из проведенных опытов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ

Фуксин основной спиртовой раствор – насыщенный

Фуксин основной кристаллический – 10 г

Этиловый спирт, 96% - 100 мл

Фуксин растворяют в 100 мл 96%-ного этанола. Раствор может храниться долгое время в бутылке из темного стекла с притертой пробкой.

Фуксин основной карболовый – фуксин Циля

Фуксин основной кристаллический – 1 г

Карболовая кислота (фенол) - 5 г

Этиловый спирт, 96° - 10 мл

Дистиллированная вода - 100 мл

При приготовлении раствора предварительно взвешивают определенное количество (1 г) фуксина основного кристаллического, вносят в фарфоровую ступку и растирают с определенным количеством (5 г) карболовой кислоты, добавляя спирт небольшими порциями и дистиллированную воду до полного растворения кристаллов, после чего приливают оставшуюся воду. Приготовленный краситель ставят в термостат при 37 °С на двое суток. Затем отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр.

Фуксин основной карболовый устойчив и может храниться долго. Хранить следует в бутылке из темного стекла с притертой пробкой.

Фуксин основной карболовый можно приготовить другим способом:

Вначале готовят два раствора.

1-й раствор

Фуксин основной кристаллический – 1 г

Этиловый спирт, 96° - 10 мл

Смесь растирают в фарфоровой ступке до полного растворения кристаллов фуксина.

2-й раствор

Карболовая кислота – 5 г

Дистиллированная вода – 95 мл

Воду подогревают до 50 °С для лучшего растворения карболовой кислоты. Второй раствор вливают в первый, хорошо взбалтывают и фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

Фуксин основной, водный (фуксин Пфейффера)

Карболовый фуксин Циля – 10 мл

Дистиллированная вода - 90 мл

Водный фуксин нестойк, его лучше готовить непосредственно перед употреблением. Раствор водного фуксина может храниться не более 10 дней.

Карболовый генциановый фиолетовый

Генциановый фиолетовый (кристаллы) – 1 г

Этиловый спирт, 96% - 10 мл

Карболовая кислота - 5 г

Дистиллированная вода - 100 мл

Техника приготовления карболового генцианового фиолетового такая же, как карболового фуксина Циля.

При приготовлении карболового генцианового фиолетового можно также готовить предварительно два раствора.

1-й раствор

Генциановый фиолетовый – 1 г

Этиловый спирт, 96% - 10 мл

2-й раствор

Карболовая кислота – 5 г

Дистиллированная вода – 95 мл

Последовательность и способ приготовления первого и второго растворов такие же, как и при приготовлении карболового фуксина Циля.

Приготовление красящих бумажек генцианвиолета (по Синеву)

Для приготовления бумажек фильтровальную бумагу предварительно испытывают на пригодность. Для этого полоску фильтровальной бумаги погружают в спиртовой раствор красителя (карболового генцианового фиолетового), высушивают на воздухе. Хорошая бумага окрашивается равномерно без пятен. Если небольшой кусок такой бумаги положить на стекло с несколькими каплями воды, он сразу же пропитается водой и краситель через несколько секунд перейдет в раствор. Бумагу для пропитывания нарезают полосками (шириной 2,5-3 см, длиной 30 см) и погружают в краситель так, чтобы смачивались обе поверхности. Затем полоски

вынимают, высушивают на воздухе при комнатной температуре или в термостате при 37° С.

Пропитывать красящиеся бумажки можно также спиртовым раствором генцианвиолета следующего состава:

Генциановый фиолетовый (кристаллы) – 1 г

Спирт этиловый, 96° - 100 мл

Глицерин - 5 мл

Метиленовый синий (насыщенный спиртовой раствор)

3 г метиленового синего растворяют в 100 мл 96%-ного этанола. Раствор выдерживают 2-3 дня, периодически взбалтывая. Затем фильтруют через бумажный фильтр. Раствор устойчив.

Раствор бриллиантовой зелени (раствор малахитового зеленого)

Водный насыщенный раствор готовится путем растворения 10 г малахитового зеленого в 10 мл дистиллированной воды. Спиртово-водный раствор: 10 г малахитового зеленого смешивается с 80 мл дистиллированной воды и 20 мл 96%-ного этанола.

Метиленовый синий 1:40

1 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего смешивают с 40 мл дистиллированной воды.

Метиленовый синий, щелочной раствор (по Леффлеру)

К 100 мл дистиллированной воды прибавляют 30 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего и 1 мл 1%-ного водного раствора гидроксида калия.

Метиленовый синий по Финку

Отдельно взвешивают 0,9 г гидрофосфата натрия, 13,6 дигидрофосфата калия и 0,1 г метиленового синего. Каждую навеску растворяют в 500 мл дистиллированной воды. Смешивают 0,25 мл первого раствора с 99,75 мл второго и 100 мл третьего (рН 4,6).

Сафранин (водный)

10 мл 2,5%-ного раствора сафранина в 96%-ном этаноле смешивается со 100 мл дистиллированной воды.

Раствор Люголя (в модификации Грама)

В ступку вместимостью 30-50 мл помещают 1 г кристаллического йода и 2 г йодида калия, растирают смесь пестиком, добавляют 1 мл дистиллированной воды, продолжают растирать кристаллы и добавляют еще 5 мл воды. При этом йод растворяется в йодиде калия. Раствор количественно переносят в склянку и доводят общий объем до 300 мл. Раствор годен не более 30 дней, хранят его в прохладном месте, в темноте, лучше в посуде оранжевого цвета.

Раствор Люголя для выявления гликогена и гранулезы

Кристаллический йод – 1 г

Йодид калия – 3 г

Вода дистиллированная – 300 мл

Раствор готовят так же, как и предыдущий.

Для обнаружения гликогена можно также использовать крепкий раствор йода

Кристаллический йод – 7 г

Йодид калия – 20 г

Вода дистиллированная – 100 мл

Краска Муромцева

Готовят два раствора:

1-й раствор

Фуксин основной – 0,15 г

Спирт, 96% – 20 мл

Кристаллическая карболовая кислота – 10 г

2-й раствор

Метиленовый синий – 2,5 г

Дистиллированная вода – 200 мл

Оба раствора смешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

Раствор туши для выявления капсул

Смешивают 10 мл жидкой натуральной туши с 90 мл дистиллированной воды. Затем раствор центрифугируют 15-20 мин. Верхний слой переносят в пробирку и автоклавируют 30 мин (0,05 МПа, температура 110 °С). После автоклавирования раствор отстаивают две недели, после чего его можно использовать.

Список используемой литературы

1. Вербина Н.М., Каптерева Ю.В. Микробиология пищевых производств: Учебник. – М.: Агропромиздат, 1988. – 256 с.
2. ГОСТ 26668-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Порядок отбора проб для микробиологических анализов».
3. ГОСТ 9225-84 «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа».
4. ГОСТ 10444.12-88 «Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов».
5. ГОСТ 25102-90 «Молоко и молочные продукты. Методы определения содержания спор мезофильных анаэробных бактерий».
6. Королева Н.С. Основы микробиологии и гигиены молока и молочных продуктов. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 168 с.
7. Лерина И.В., Педенко А.И. Лабораторные работы по микробиологии: Учеб. Пособие для товаровед. и технол. фак. торг. вузов. – 2 изд., перераб. – М.: Экономика, 1986. – 128 с.
8. Медико-биологические требования и санитарные нормы качества продовольственного сырья и пищевых продуктов. – М.: Изд-во стандартов, 1996.
9. Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов: Методические указания МУК 4.2.577-96. – М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1998. –94 с.
10. Методы санитарно-микробиологического анализа питьевой воды: Методические указания МУК 4.2.671-97. – М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1997. –36 с.

- 11.**Микробиологические основы молочного производства: Справочник / Л.А. Банникова, Н.С. Королева, В.Ф. Семенихина; Под ред. канд. техн. наук Я.И. Костина. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН
ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ

СВЕДЕНИЯ О СЕРТИФИКАТЕ ЭП

Сертификат 138886899515110284398995661652590028330255961003

Владелец Демакова Людмила Николаевна

Действителен с 19.03.2024 по 19.03.2025